

Philipps



Universität  
Marburg

# **Der Nachweis eines Mitglieds der OMP85-Proteinfamilie im Apikoplasten von *Toxoplasma gondii***

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

dem  
Fachbereich Biologie  
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von  
**Irine Bietz**  
aus Manila  
Marburg/Lahn 2012

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation angenommen  
am: 15.06.12

Prüfungskommission:

PD Dr. Jude Przyborski      (Erstgutachter)

Prof. Dr. Uwe G. Maier      (Zweitgutachter)

Prof. Dr. Klaus Lingelbach

Prof. Dr. Erhard Bremer

Tag der Disputation: 11.07.12

## **I. Veröffentlichungen**

**Gehde N, Hinrichs C, Montilla I, Charpian S, Lingelbach K, Przyborski JM.** (2009). Protein unfolding is an essential requirement for transport across the parasitophorous vacuolar membrane of *Plasmodium falciparum*. Mol Microbiol. 71(3):613-28.

**Bietz S, Montilla I, Külzer S, Przyborski JM, Lingelbach K.** (2009). Recruitment of human aquaporin 3 to internal membranes in the *Plasmodium falciparum* infected erythrocyte. Mol Biochem Parasitol. 167(1):48-53.

## 1 Einleitung

### 1.1 Toxoplasmose und sein Erreger

#### 1.1.1 *Toxoplasma gondii*

*Toxoplasma gondii* ist ein obligat intrazellulärer Parasit, der 1908 von Nicolle und Manceaux in einem Hamsterähnlichen Nagetier, namens *Ctenodactylus gundi*, in Afrika entdeckt wurde. Der Name des Parasiten leitet sich von dem griechischen Wort „toxon“ zu Deutsch „Bogen“ und dem Namen des Nagetiers, in dem es entdeckt wurde, ab. Im selben Jahr beschrieb Splendore in Brasilien den gleichen Parasiten in einem Kaninchen (Black und Boothroyd, 2008). In den darauffolgenden Jahren wurden immer mehr *T. gondii* ähnliche Organismen entdeckt, vor allem in Vogelarten (Dubey, 2002). 1937 gelang es Sabin und Olitsky erstmals den Parasiten aus Tieren zu isolieren und zwei Jahre später waren es die drei amerikanischen Pathologen Wolf, Cowen und Page, die dieses Pathogen zum ersten Mal aus dem Menschen isolieren konnten (Dubey, 2008).

*T. gondii* gehört zum Stamm der Apikomplexa, einer Gruppe von obligat intrazellulären Parasiten, die die Ursache von gravierenden Krankheiten bei Mensch und Tier sind. Pathogene, die ebenfalls zu dieser Gruppe zählen, sind *Plasmodium ssp.*, die Erreger der Malaria, *Cryptosporidium ssp.*, Erreger von Durchfallerkrankungen und *Babesia ssp.*, die bei splenektomierten oder immunsupprimierten Patienten eine in Bezug auf die Symptome der Malaria ähnliche Erkrankung hervorrufen können. Toxoplasmose ist eine weltweit verbreitete und häufig auftretende Zoonose, die von *T. gondii* hervorgerufen wird (Tenter *et al.*, 2000). Die Infektion des Menschen erfolgt entweder durch die perorale Aufnahme von Oozysten, welche von Tieren, die der Familie der *Felidae* angehören, ausgeschieden werden oder durch den Verzehr von Fleisch der Zwischenwirte, die Gewebezysten mit *Toxoplasmen* enthalten (Jones *et al.*, 2001). Spezies der Familie der *Felidae* stellen den Endwirt des Parasiten dar. Die geringe Wirtsspezifität und die Fähigkeit alle kernhaltigen Zellen zu infizieren, befähigen *T. gondii* ein großes Artenspektrum von warmblütigen Vertebraten, darunter den Menschen, zu infizieren. Schätzungsweise sind zwei Milliarden Menschen weltweit und somit fast ein Drittel der Weltbevölkerung mit dem Erreger infiziert (Grigg und Sundar, 2009). Die Toxoplasmose selbst stellt in den meisten Fällen eine harmlose Erkrankung dar und die meisten Infektionen verlaufen asymptomatisch. Immunkompetente Menschen, bei denen die Erkrankung ausbricht, zeigen Symptome, die der einer leichten Grippe ähneln wie z.B. Fieber, Muskelschmerzen und Schwellungen der Lymphknoten. In diesen Fällen wird die Erkrankung typischerweise durch das Immunsystem kontrolliert und

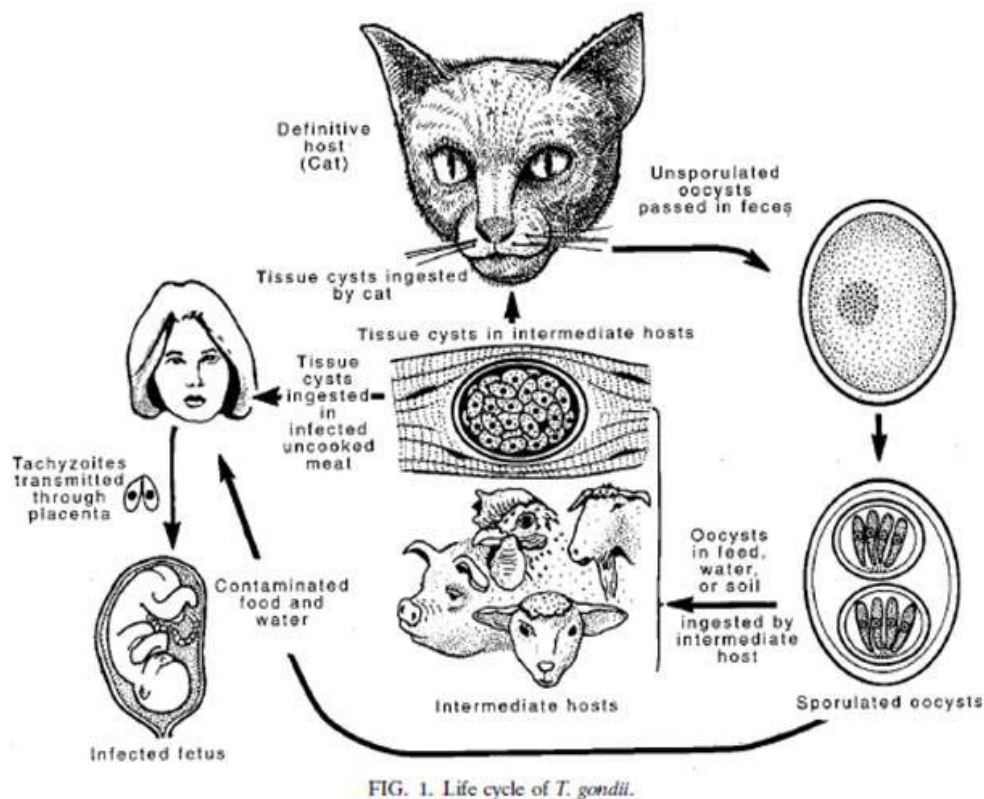
es bedarf selten einer Therapie (Ho-Yen, 2001). Des Weiteren führt die Erkrankung zu einer lebenslangen chronischen Infektion. Bei immundefizienten Menschen hingegen kann es zu schwerwiegenderen Krankheitsbildern wie denen der Myokarditis, Meningoenzephalitis oder Augenschädigungen kommen. Bei schwangeren Frauen, die sich während einer Schwangerschaft erstmalig mit *T. gondii* infizieren, ist eine diaplazentare Übertragung auf den Fötus möglich, die gravierende Folgen in Form von Gehirnschäden, Chorioretinitis u.a. Arten von Missbildungen mit sich bringen kann. Bei Frauen hingegen, die vor oder zu Beginn der Schwangerschaft eine inapparente Infektion mit dem Erreger und somit auch IgG-Antikörper aufweisen, besteht für den Fötus keinerlei Gefahr für eine pränatal erworbene Toxoplasmose.

### 1.1.2 Der Lebenszyklus von *Toxoplasma gondii*

Der Lebenszyklus von *T. gondii* lässt sich in zwei Phasen gliedern, einer sexuellen und einer asexuellen Phase. Erstere findet nur im Endwirt, letzteres in allen warmblütigen Tieren, einschließlich dem Menschen statt (Abbildung 1-1). Im Allgemeinen unterscheidet man zwischen drei infektiösen Stadien, den Tachyzoiten, Bradyzoiten und Sporozoiten (Sibley, 2009). Die beiden erstgenannten Formen gehen aus der asexuellen Phase hervor, während die Sporozoiten nur in der sexuellen Phase gebildet werden. Die Infektion der Zwischen- und Fehlwirte mit *Toxoplasmen* erfolgt durch die orale Aufnahme der Oozysten, die von dem Endwirt mit dem Kot ausgeschieden werden, oder durch den Verzehr von rohem, zystenhaltigem Fleisch. Nach der Aufnahme gelangen die Parasiten aus dem Darm in die Blutbahn und von dort aus in verschiedene Organe, wo sie mit dem asexuellen und lytischen Teil ihres Lebenszyklus beginnen. Dabei kann das invasive Tachyzoitenstadium fast alle kernhaltigen Zellen infizieren.

In der akuten Phase der Infektion teilt sich der Parasit durch einen Prozess namens Endodyogenie alle sechs bis neun Stunden. Die Endodyogenie ist eine Form der asexuellen Vermehrung, bei der zwei Tochterzellen innerhalb einer Mutterzelle gebildet werden. Diese Form der Vermehrung erfolgt so lange bis letztlich die Wirtszelle ruptiert. Danach folgen weitere Vermehrungszyklen, die mit der Invasion benachbarter Wirtszellen beginnen, und mit der vollständigen Lyse der infizierten Zellen enden (Morrisette und Sibley, 2002). Durch unterschiedliche Antigene des Parasiten wird die humorale und zelluläre Immunantwort des Wirtes eingeleitet, die einerseits zur Begrenzung der Vermehrung der Tachyzoiten, andererseits zu deren Umwandlung in Bradyzoiten führt. Bei letzterem handelt es sich um das Stadium, welches für die chronische Infektion mit *Toxoplasmen* verantwortlich und in

Gewebiszysten vorzufinden ist (Dubey und Frenkel, 1976). Die Bradyzoiten enthaltenden Zysten findet man vor allem in langlebigen Zellen wie z.B. Neuronen und Muskelzellen und deren Ausbildung stellt eine Immunevasionsstrategie des Parasiten dar. Auf diesem Wege können die Parasiten lebenslang im jeweiligen Organismus persistieren (Dubey, 1997).



Dubey *et al.*, 1998

### Abbildung 1-1: Der Lebenszyklus von *Toxoplasma gondii*

Der Lebenszyklus von *T. gondii* lässt sich in zwei Phasen, die sexuelle bzw. die asexuelle, unterteilen. Im Vergleich zur asexuellen Phase, die in allen warmblütigen Tieren u.a. dem Menschen stattfinden kann, erfolgt die sexuelle Phase nur in Arten, die der Familie der *Felidae* angehören. Letztere scheiden Sporozysten enthaltende Oozysten aus, die von Zwischen- und Fehlwirten aufgenommen werden können. In diesen erfolgt dann die Umwandlung der Sporozoiten in Tachyzoiten, die schließlich die asexuelle, lytische Phase einleiten. Als Reaktion auf die Immunantwort des Wirtes erfolgt die Transition der Tachyzoiten in Bradyzoiten, welche in Gewebiszysten vorliegend für die chronische Infektion verantwortlich sind.

Katzen infizieren sich durch die Aufnahme von Oozysten oder zystenhaltigem Fleisch. Nach dem Verdau der Zysten wird die Zystenwand mit Hilfe von Enzymen im Verdauungstrakt aufgelöst, wodurch die Bradyzoiten in den Dünndarm gelangen und dort die sexuelle Phase einleiten können (Dubey, 1998). Aus den Merozoiten entstehen Mikro- und Makrogameten,

die zu einer Zygote verschmelzen und somit zur Bildung einer Oozyste führen. Diese enthalten jeweils zwei Sporozysten mit wiederum je zwei Sporozoiten und werden mit dem Kot der Katze ausgeschieden. Nach außen gelangt, können sie wieder von Zwischen- und Fehlwirten oder auch von einem Endwirt aufgenommen werden, in denen dann die asexuelle bzw. sexuelle Phase des Lebenszyklus eingeleitet wird.

### 1.2 Der zellbiologische Aufbau von *Toxoplasma gondii*

Apikomplexe Parasiten weisen bezüglich ihrer Kompartimente und Organellen eine ähnliche Organisation auf wie viele andere eukaryotische Zellen. Eine Besonderheit stellt jedoch der namensgebende Apikalkomplex an ihrem apikalen Ende dar. Dieser Komplex umfasst die Rhoptrien, Micronemen und sogenannten „Dense Granules“ und nimmt bei der Invasion in eine Wirtszelle eine zentrale Rolle ein (Sam-Yellowe, 1996). Während Micronemen Liganden für Wirtszellrezeptoren beinhalten und diese ausgelöst durch intrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  freisetzen (Carruthers und Sibley, 1999), sezernieren Rhoptrien während der Invasion Proteine, die Bestandteile der sogenannten Moving Junction darstellen und an der Genese der parasitophoren Vakuole (PV) beteiligt sind (Boothroyd und Dubremetz, 2008). Die Freisetzung der Micronemenproteine erfolgt dabei zeitlich vor der Sekretion der Rhoptrienproteine (Carruthers und Sibley, 1997). Im Vergleich zu den Rhoptrienproteinen sind die der Dense Granules in die Reifung bzw. Modifikation der PV involviert (Mercier *et al.*, 2005) und tragen somit auch zur Bildung der PV bei. Diese bildet sich während der Invasion aus der Wirtszellmembran und weist neben den Bestandteilen der Wirtszelle auch parasitäre Komponenten auf. Die PV stellt ein spezielles Kompartiment innerhalb der infizierten Wirtszelle dar und bildet eine Art Schutzbarriere für den Parasiten, deren Membran aufgrund der von den Dense Granules sezernierten Proteine derart modelliert wird, dass eine Fusion der PV mit Wirtszellendosomen und –Lysosomen unterbunden wird (Mordue und Sibley, 1997; Joiner *et al.*, 1990; Coppens *et al.*, 2006). Auf diesem Wege gelingt es dem Parasiten seinem Abbau durch die Wirtszelle zu umgehen. Als Schnittstelle zwischen Parasit und Wirtszellzytosol dient die PV nicht nur als Barriere sondern hat auch eine Funktion bei der Beschaffung von Nährstoffen (Martin *et al.*, 2006). Der Zugang zum Wirtszytosol wird durch unspezifische Poren in der parasitophoren Vakuolenmembran (PVM) vermittelt, welche für Moleküle mit einer Masse von ~1,3 kDa (Schwab *et al.*, 1994), beispielsweise für bestimmte Aminosäuren, Nukleotide und Zucker permeabel ist. Des Weiteren verschafft sich der Parasit durch einen direkten Kontakt der PVM mit den

Mitochondrien und dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) seiner Wirtszelle Zugang zu Lipiden (Crawford *et al.*, 2006; Coppens, 2006; Gupta *et al.*, 2005), die er für seinen eigenen Metabolismus verwendet.

Wie andere eukaryotische Zellen besitzt *T. gondii* ein ER, welches mit dem Zellkern ein Kontinuum bildet, jedoch nur eine einzige Golgi-Zisterne (Pelletier *et al.*, 2002). Ob dieser Parasit Peroxisomen besitzt, ist noch nicht geklärt und es liegen zu diesem Zeitpunkt gegensätzliche Publikationen vor (Ding *et al.*, 2000; Kaasch und Joiner, 2000). Darüber hinaus weist *T. gondii* zwei weitere Organellen auf, ein Mitochondrium und eine sogenannte apikomplexe Plastide, auch Apikoplast genannt (apicomplexan plastid), die aus einer Endosymbiose hervorgegangen sind.

### 1.3 Endosymbiosen und die Entstehung der Plastiden

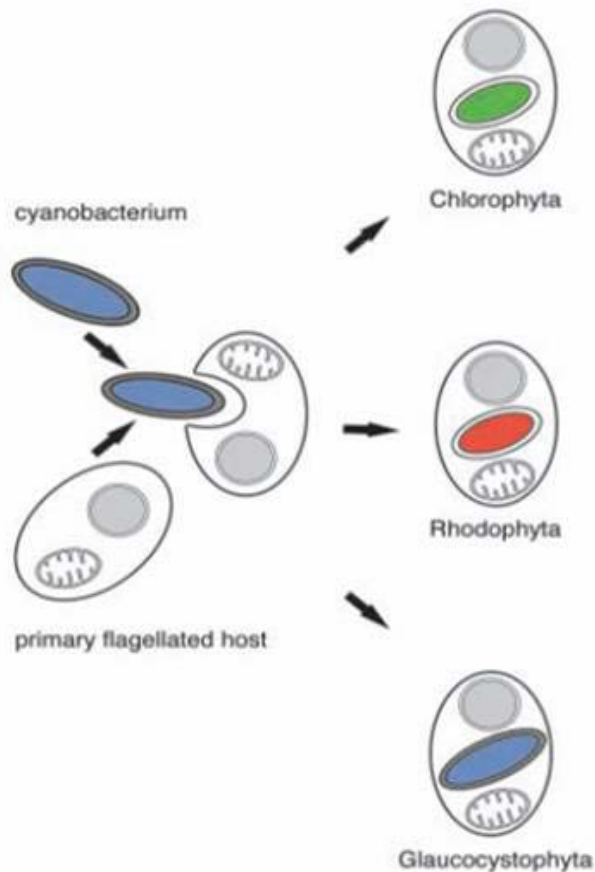
#### 1.3.1 Primäre Endosymbiose

Die Endosymbiose ist wichtiger Teil der Evolution und spielt eine zentrale Rolle in der Entstehung eukaryotischer Organellen. Mitochondrien und Plastiden stellen hierbei zwei Organellen dar, die durch den Prozess der primären Endosymbiose entstanden sind. Im Falle des Mitochondriums war es ein  $\alpha$ -Proteobakterium, das von einer eukaryotischen, heterotrophen Zelle aufgenommen wurde, während es bei der Plastide ein Cyanobakterium war. Im Laufe der Zeit wurden beide Endosymbionten wichtige Bestandteile der jeweiligen eukaryotischen Zellen und zu Organellen mit zwei sie umhüllenden Membranen reduziert. Während die innere Membran primärer Plastiden dem Anschein nach nur bakterielle Komponenten aufweist (Cavalier-Smith 2000), zeigt die äußere sowohl prokaryotische als auch eukaryotische Eigenschaften (Bölter *et al.*, 1998; Maier *et al.*, 2000).

Über die Entstehung primärer Plastiden wurde lange Zeit diskutiert. Der russische Wissenschaftler Konstantin Mereschkowski stellte Anfang des 20. Jahrhunderts die Hypothese auf, dass Plastiden die Nachkommen einst frei lebender prokaryotischer Organismen bzw. Cyanobakterien darstellen (Kutschera und Niklas, 2005), welche von einer eukaryotischen Zelle aufgenommen wurden (Mereschkowski, 1905). Diese Hypothese wurde bis in die 70er Jahre des letzten Jahrhunderts bestritten, bis eben zu jenem Zeitpunkt, an dem Lynn Margulis diese Theorie wieder aufgriff und die bis zum heutigen Zeitpunkt akzeptierte Endosymbiontentheorie postulierte (Sagan, 1967; Margulis, 1971). Wie beschrieben, ist die Entstehung der primären Plastiden das Resultat der primären



Endosymbiose, aus der sich drei Linien, die Glaucophyten, Rhodophyten (Rotalgen) und die Chlorophyten (Grünalgen) (Stoebe und Maier, 2002) (Abbildung 1-2) entwickelten, von denen zwei eine wichtige Rolle bei der Entstehung komplexer Plastiden spielen.



Stoebe und Maier, 2002

### Abbildung 1-2: Primäre Endosymbiose

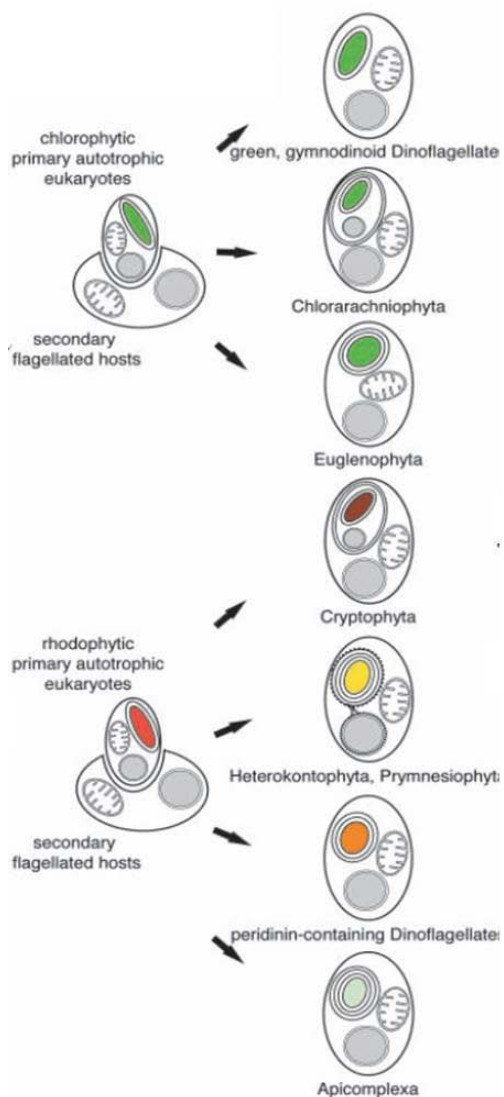
Durch die primäre Endosymbiose, bei der ein freilebendes, phototrophes Cyanobakterium von einer eukaryotischen Zelle aufgenommen wurde, sind die drei Linien der Chlorophyten, Rhodophyten und Glaucophyten entstanden.

Im Laufe der Evolution kam es zu einer drastischen Reduktion des primären Endosymbionten, die u.a. mit dem Transfer zahlreicher Gene in den Wirtszellkern verbunden war (Palenik, 2002; Gould *et al.*, 2008). Dies könnte für die Wirtszelle einige Vorteile bezüglich der Regulation der Expression der transferierten Gene mit sich gebracht haben,

jedoch entstand damit auch gleichzeitig das Problem, dass die im Wirtszellkern kodierten Proteine wieder in die Plastide rückimportiert werden müssen und somit eine Proteinimportmaschinerie nötig wurde.

### 1.3.2 Sekundäre Endosymbiose

Neben den primären Plastiden gibt es komplexere Plastiden, die im Vergleich zu den erstgenannten mehr als zwei Membranen aufweisen. Diese Art von Plastiden ist durch einen Prozess entstanden, der als sekundäre Endosymbiose bezeichnet wird. Im Vergleich zur primären Endosymbiose war der Endosymbiont in diesem Falle kein Prokaryot sondern eine eukaryotische Zelle, was zur Entstehung von Chimären aus zwei Eukaryoten führte (Cavalier-Smith 2003).



**Abbildung 1-3: Sekundäre Endosymbiose**  
(Abgewandelt nach Stoebe und Maier, 2002)

Durch die Aufnahme einer phototropen, eukaryotischen Zelle durch eine heterotrophe, eukaryotische Zelle entstanden die Organismen, die sich durch den Besitz einer sekundären Plastide auszeichnen. Zu diesen Organismen zählen die Chlorarachniophyten und Euglenophyten, die sich aus einer sekundären Endosymbiose mit einer Grünalge entwickelten und die Chromalveolaten, bei denen der Endosymbiont auf eine Rotalge zurückzuführen ist. Zu der Gruppe der Chromalveolaten zählen die Cryptophyten, Haptophyten, Heterokontophyten, Apikomplexa und Ciliaten, wobei letztere ihre Plastide wieder verloren haben.

Während viele Daten darauf hindeuten, dass sich die primäre Endosymbiose im Laufe der Evolution nur ein Mal ereignete (Rodríguez-Ezpeleta *et al.*, 2005), scheint die sekundäre Endosymbiose mehrmals stattgefunden zu haben (Rogers *et al.*, 2007; Keeling, 2010). In Abhängigkeit des eukaryotischen Endosymbionten, einer Grün- oder Rotalge, entstanden mehrere verschiedene Linien, die eine sekundäre Plastide aufweisen (Abbildung 1-3). Die Symbiose einer eukaryotischen Zelle mit einer Grünalge führte zur Entstehung der beiden Linien der Chlorarachniophyten und Euglenophyten, die beide gemeinsam als die „grüne Linie“ zusammengefasst werden, wohin gegen die Gruppe der Chromalveolaten das Ergebnis einer Endosymbiose mit einer Rotalge darstellt. Unter der Gruppe der Chromalveolaten fasst man einerseits die sogenannten Chromisten (Cryptophyten, Haptophyten und Heterokontophyten), andererseits die Alveolaten (Apikomplexa, Ciliaten, Dinophyten, Perkinsidae) zusammen (Gould *et al.*, 2008).

Während einige dieser Vertreter sich durch den Besitz einer sekundären Plastide auszeichnen, haben andere diese im Laufe der Zeit wieder verloren, wie dies zum Beispiel bei den Ciliaten der Fall ist (Cavalier-Smith, 2002; Cavalier-Smith und Chao, 2006; Archibald, 2008).

### 1.3.3 Die sekundären Plastiden der Chromalveolaten

Die sekundären Plastiden der Chromalveolaten sind fast alle von vier Membranen umgeben, wobei die der Peridinin-haltigen Dinoflagellaten mit drei Membranen eine Ausnahme bildet. Betrachtet man die einzelnen Membranen, so gibt es Hinweise darauf, dass die äußerste Membran auf die Membran der Vakuole zurückzuführen ist, die bei der Aufnahme des eukaryotischen Endosymbionten, der bereits eine primäre Plastide enthielt, gebildet wurde (Cavalier-Smith, 2000). Im Falle der Cryptophyten, Haptophyten und Heterokontophyten bildet diese äußere Plastidenmembran ein Kontinuum mit dem ER der Wirtszelle und ist daher mit 80S-Ribosomen besetzt (Bolte *et al.*, 2009). Anders sieht es bei den Plastiden der Chlorarachniophyten und Apikomplexa aus, bei denen diese Art der Verbindung nicht vorzuliegen scheint, obwohl es im Falle des Apikoplasten von *Toxoplasma gondii* erste Hinweise für direkte Kontaktstellen zwischen der Plastide und dem ER gibt (Tomova *et al.*, 2009). Die zweite Membran, auch periplastidäre Membran (PPM) genannt, repräsentiert allem Anschein nach die Plasmamembran der Rotalge, die von der heterotrophen, eukaryotischen Zelle aufgenommen wurde (Cavalier-Smith, 2001). Die beiden innersten

Membranen stammen von den Membranen der primären Plastide der phagocytierten Rotalge ab (Gould *et al.*, 2008).

### 1.3.4 Der Apikoplast

Fast alle Protisten, die dem Stamm der Apikomplexa angehören, besitzen eine nicht-photosynthetisch aktive, sekundäre Plastide, die man als Apikoplast bezeichnet (Sato, 2011). Zu diesen Protisten zählen zum Beispiel *Plasmodium falciparum*, *Toxoplasma gondii*, *Eimeria tenella*, *Babesia bovis* und *Theileria annulata*. *Chromera spp.* gilt als einziges photosynthetisch aktives Mitglied der Apikomplexa (Lim und McFadden, 2010). Andere Mitglieder wie die Gregarinen (Toso und Omoto, 2007) oder *Cryptosporidium spp.* (Zhu *et al.*, 2000; Abrahamsen *et al.*, 2004) haben diese sekundäre Plastide im Laufe der Zeit wieder verloren.

Der Apikoplast ist von vier Membranen umgeben. Während die äußerste wahrscheinlich von der Phagosomenmembran abstammt, die bei der Aufnahme der Rotalge entstand, rühren die drei restlichen Membranen von der Plasmamembran und den beiden Plastidenmembranen des eukaryotischen Endosymbionten her (DeRocher *et al.*, 2012). Diese sekundäre Plastide scheint ein für die Apikomplexa essentielles Organell zu sein (Fichera und Roos, 1997; Dahl *et al.*, 2006; Goodman und McFadden, 2007) und aufgrund der Tatsache, dass es in den Wirtszellen der Parasiten kein entsprechendes Organell gibt, stellt es ein vielversprechendes Ziel für die Entwicklung von Medikamenten zur Bekämpfung von Malaria und Toxoplasmose dar (Lim und McFadden, 2010). Hinweise dafür, dass der Apikoplast seinen Ursprung in Algen hat, lieferten Sequenzanalysen des 35 kb großen Genoms (McFadden *et al.*, 1996), welches hauptsächlich Gene für die Transkription und Translation enthält (Wilson und Williamson, 1997). Sowohl die geringe Größe des Genoms als auch die geringe Anzahl der darin kodierten Plastidenproteine sind Resultat des horizontalen Gentransfers, der dazu führte, dass die meisten Apikoplastenproteine nun im Wirtszellkern kodiert sind.

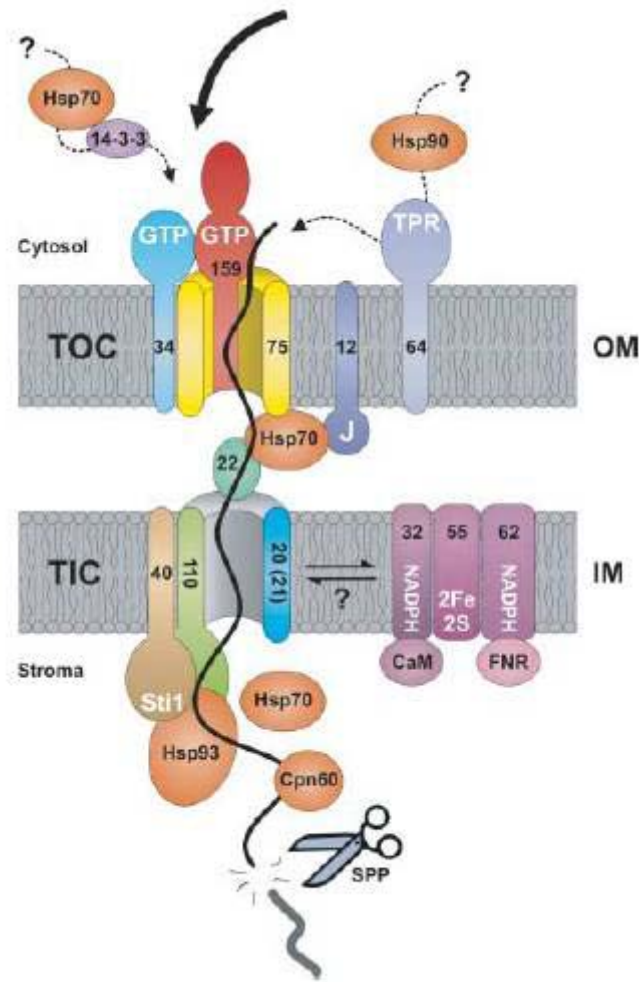
Obwohl der Apikoplast die Fähigkeit zur Photosynthese verloren hat (Foth und McFadden, 2003), finden in ihm noch einige Stoffwechselwege statt, die für den Parasiten essentiell zu sein scheinen. Zu diesen Metabolismen zählen die Isoprenoidbiosynthese über den DOXP Pathway, die Fettsäuresynthese mit Hilfe der TyplI Fettsäuresynthase, die Synthese von Eisen-Schwefel Clustern und die Hämsynthese in Zusammenarbeit mit dem Mitochondrium (Gardner *et al.*, 2002; Roos *et al.*, 2002; Ralph *et al.*, 2004). Da neben vielen weiteren Apikoplastenproteinen auch viele Enzyme der genannten Metabolismen im Wirtszellkern

kodiert werden, müssen diese nach der Synthese in die Plastide transportiert werden. Wie der posttranslationale Transport im Detail aussieht, wird in einem späteren Abschnitt beschrieben.

### 1.4 Proteintransport in Plastiden

#### 1.4.1 Proteintransport in primäre Plastiden

Die meisten Proteine der primären Plastiden werden als Folge des horizontalen Gentransfers im Nukleus der Wirtszelle kodiert und müssen nach ihrer Synthese an freien Ribosomen im Zytosol zu ihrem Bestimmungsort transportiert werden. Um dies zu bewerkstelligen, weisen die Vorläuferproteine N-terminal ein sogenanntes Transitpeptid (TP) auf, das als Zielsteuerungssequenz fungiert. Jedoch bedarf es neben dem Transitpeptid noch weiterer Komponenten, die für den Import essentiell sind. Dabei handelt es sich um Proteinkomplexe bzw. Importmaschinerien im Zytosol und in der äußeren und inneren Membran der Plastide. Nach der Synthese im Zytosol interagieren die zu importierenden Proteine zunächst mit solchen Proteinkomplexen, welche die Vorläuferproteine in einem für den Import kompatiblen Zustand halten (Kovács-Bogdán *et al.*, 2010). Bei diesen Komplexen handelt es sich u.a. um den sogenannten „Guidance Komplex“, der sich aus einem der zu importierenden Präproteinen, den 14-3-3 Proteinen, Hitzeschockproteinen (Hsp70) und weiteren, bis jetzt noch nicht identifizierten Proteinen zusammensetzt (May und Soll, 2000). Ein anderer Komplex, der ebenfalls im Cytosol mit Präproteinen interagieren kann, weist im Gegensatz zu dem eben genannten Komplex eine Zusammensetzung aus Hsp70- und Hsp90-Chaperon auf (Qbadou *et al.*, 2006). An der Plastide angelangt, werden die zu transportierenden Proteine an die Importmaschinerien in den Plastidenmembranen weitergegeben. Bei diesen Komplexen handelt es sich um den sogenannten „Translocon of the outer chloroplast membrane“ (Toc) Komplex bzw. den „Translocon of the inner chloroplast membrane“ (Tic) Komplex. Gemeinsam vermitteln sie den Import von zellkernkodierten Proteinen in die Plastide (Soll und Schleiff, 2004; Bédard und Jarvis, 2005; Kessler und Schnell, 2006). Der Toc-Komplex in der äußeren Chloroplastenmembran ist hierbei für die Erkennung des Vorläuferproteins bzw. des daran gebundenen Transitpeptids und den Transport über die erste Membran verantwortlich.



Jarvis, 2008

## Abbildung 1-4 : Schematische Darstellung des Proteintransports in primäre Plastiden

Die Synthese der im Wirtszellkern kodierten Plastidenproteine findet an freien Ribosomen im Cytosol statt. Als Vorläuferproteine weisen sie am N-Terminus ein Transitpeptid auf, welches als Zielsteuerungssequenz fungiert und von Toc34 und Toc159 des Toc-Komplexes in der äußeren Plastidenmembran erkannt wird. Über Toc75, einer weiteren Komponente des Toc-Komplexes, gelangen die Vorläuferproteine in den Intermembranraum, den sie mit Hilfe von Toc12, Toc22 und Hsp70 passieren. Über Tic20 oder Tic110 des Tic-Komplexes gelangen sie ins Stroma, in dem die Abspaltung des Transitpeptids durch die stromale Prozessierungspeptidase (SPP) und die anschließende Faltung der Proteine in ihre endgültige Konformation statt finden.

Er setzt sich im Wesentlichen aus den drei Komponenten Toc159, Toc75 und Toc34 zusammen (Schleiff *et al.*, 2003). Während Toc34 und Toc159 beide als GTP-bindende Rezeptoren für das Transitpeptid fungieren (Hirsch *et al.*, 1994; Kessler *et al.*, 1994; Perry und Keegstra, 1994; Ma *et al.*, 1996; Akita *et al.*, 1997; Nielsen *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2000; Sveshnikova *et al.*, 2000), stellt Toc75 ein integrales Membranprotein dar, das als  $\beta$ -Barrel Protein der OMP85-Familie angehört (Schnell *et al.*, 1994). Es bildet höchstwahrscheinlich

den Kanal in der äußeren Chloroplastenmembran (Schnell *et al.*, 1994; Hinnah *et al.*, 1997) und interagiert mit den beiden genannten Rezeptoren (Seedorf *et al.*, 1995; Nielsen *et al.*, 1997), von welchen es das zu transportierende Vorläuferprotein erhält. Basierend auf den elektronenmikroskopischen Ergebnissen von Schleiff und Kollegen (Schleiff *et al.*, 2003) besteht solch ein Toc-Kernkomplex aus vier Kanälen, die jeweils ein Toc75 und ein Toc34 Protein enthalten, und ein einziges Toc159 Molekül umgeben. Mit Hilfe von Toc12, Toc22 und Hsp70 wird anschließend der Transport des Vorläuferproteins über den Intermembranraum ermöglicht, wobei die genannten Proteine den Vorläufer an Tic vermitteln (Jarvis, 2008).

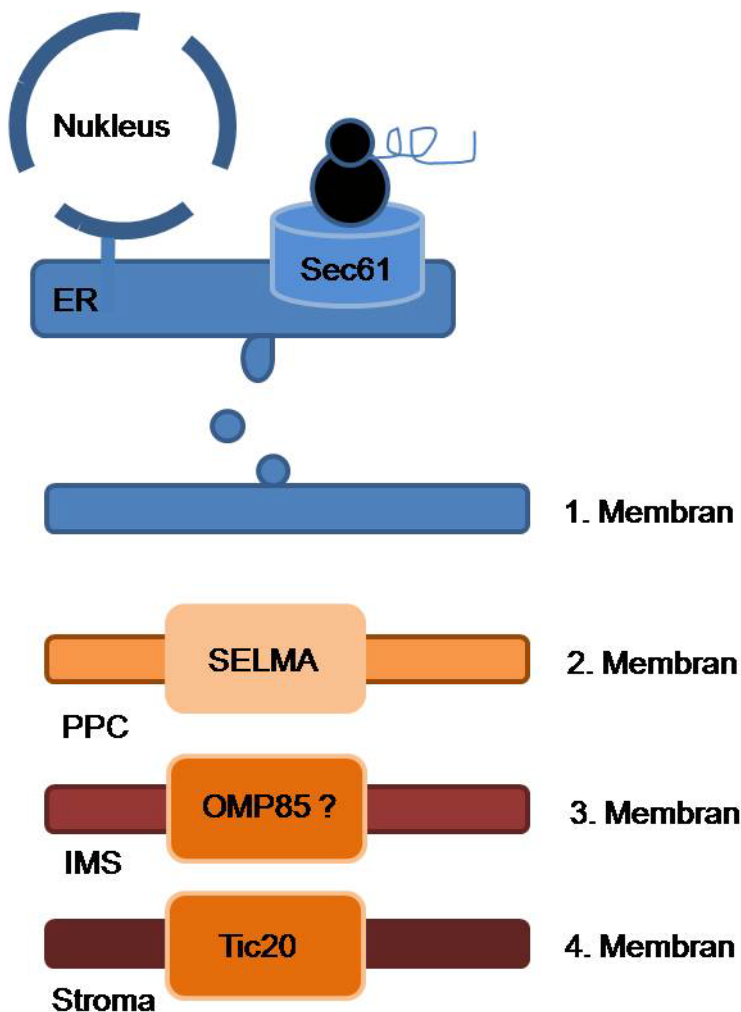
Der Weitertransport der Vorläufer- oder Präproteine über die verbleibende Membran erfolgt dann mit Hilfe des Tic-Komplexes, der sich aus vielen verschiedenen Proteinen zusammensetzt, deren Funktionen bis jetzt jedoch noch weitgehend ungeklärt sind. Mögliche Kandidaten für die Translokationspore sind Tic20 und Tic110 (Reumann und Keegstra, 1999; Heins *et al.*, 2002), die in Bezug auf ihre Topologie bzw. elektrophysiologischen Eigenschaften für solch eine Funktion in Frage kommen könnten. Durch die Interaktion eines ATP-bindenden Hsp93 Moleküls mit dem Tic-Komplex gelangen die Vorläuferproteine vermutlich ins Stroma (Chou *et al.*, 2006), wo es mit Hilfe der stromalen Prozessierungspeptidase (SPP), einer Zink-Metalloprotease, zur Spaltung des Transitpeptids (Richter und Lammpa, 1998) und der Faltung der Proteine in die endgültige Konformation mit Hilfe von stromalen Chaperonen (Li und Chiu, 2010) kommt.

### 1.4.2 Proteintransport in die sekundäre Plastide der Chromalveolaten

Wie bei der primären Endosymbiose auch hat im Falle der sekundären Endosymbiose der einst frei lebende, eukaryotische Endosymbiont, welcher bereits eine primäre Plastide enthielt, nicht nur morphologische Veränderungen durchlebt, sondern auch den größten Teil seines Genoms an den Zellkern der Wirtszelle verloren (Kleine *et al.*, 2009). Die Reduktion des Nukleus des sekundären Endosymbionten war in manchen Fällen sogar so drastisch, dass es zum totalen Verlust des symbionteneigenen Nukleus kam. Ein Beispiel hierfür findet sich bei den Alveolaten (Agrawal und S triepen, 2010). Bei anderen Vertretern der Chromalveolaten, wie z.B. den Cryptophyten und den Chlorarachniophyten, findet man zwischen der zweiten und dritten Plastidenmembran jedoch noch ein Überbleibsel des Zellkerns des Endosymbionten, das man als Nucleomorph bezeichnet (Gilson und McFadden, 1996; Douglas *et al.*, 2001).

Aufgrund des horizontalen Gentransfers bedarf es neben einer Signalsequenz nun auch einer ganzen Proteintransportmaschinerie in der sekundären Plastide, die einen posttranslationalen Import der im Wirtszellkern kodierten Plastidenproteine ermöglicht. Derartige Proteine werden zunächst als Vorläuferproteine im Endoplasmatischen Retikulum synthetisiert und zeichnen sich im Vergleich zu einem reifen Plastidenprotein durch den Besitz einer zweigeteilten Signalsequenz (Bipartite topogenic signal sequence, BTS) aus. Die BTS setzt sich zusammen aus einem Signalpeptid (SP) und einem darauffolgenden Transitpeptid (TP) (Waller *et al.*, 1998; Wastl und Maier, 2000; Apt *et al.*, 2002; Gould *et al.*, 2006). Während das Signalpeptid für den kotranslationalen Transport des Vorläuferproteins über das Sec61 Translokion in das ER-Lumen verantwortlich ist (Bhaya und Grossmann, 1991; Rapoport, 2007), sorgt das Transitpeptid, nach dem es durch die Abspaltung des Signalpeptids im ER-Lumen frei zugänglich vorliegt, für den weiteren Transport des Proteins vom ER zur sekundären Plastide (Waller *et al.*, 2000). Im Stroma angekommen, erfolgt die Abspaltung des Transitpeptids durch eine Peptidase, die mit der stromalen Prozessierungspeptidase von Pflanzen verwandt zu sein scheint (Agrawal und S triepen, 2010). Des Weiteren scheint das Transitpeptid von Proteinen der sekundären Plastiden ähnliche strukturelle und funktionelle Eigenschaften zu haben wie das von Pflanzen (Ralph *et al.*, 2004). Auch wenn sich auf der Ebene der Primärsequenz keine eindeutigen Übereinstimmungen finden lassen, so gibt es scheinbar dennoch eine Gemeinsamkeit was die Nettoladung des Transitpeptids betrifft, eine positive Gesamtladung dieses Bereiches. Dabei scheint es weniger eine Rolle zu spielen, an welchen Positionen des Transitpeptids diese positiven Ladungen vorzufinden sind, entscheidend ist nur eine positive Gesamtladung. Diese ist allem Anschein nach für den weiteren Import des Proteins in die Plastide essentiell, wie man anhand von Proteinen des Apikoplasten von *Plasmodium falciparum* und *Toxoplasma gondii* (Foth *et al.*, 2003; Tonkin *et al.*, 2006) beobachten konnte. Eine weitere Eigenschaft der BTS, die in vielen Fällen für den Transport von Proteinen in das Stroma der sekundären Plastide von Cryptomonaden, Diatomeen, Haptophyten und Dinoflagellaten wichtig ist, ist das Vorhandensein einer aromatischen Aminosäure an der +1 Position des Transitpeptids (Ralph *et al.*, 2004; Kilian und Kroth, 2005; Patron *et al.*, 2005; Patron *et al.*, 2006; Gould *et al.*, 2006). *P. falciparum* bildet insofern eine Ausnahme, als dass viele der vorhergesagten Apikoplastenproteine keine aromatische Aminosäure an der genannten Position des Transitpeptids aufweisen (Spork *et al.*, 2009). Das Vorhandensein einer aromatischen Aminosäure stellt daher wahrscheinlich keine essentielle Eigenschaft eines Proteins für den Import in den Apikoplasten dar.





**Abbildung 1-5: Modell des möglichen Apikoplastenaufbaus mit der darin enthaltenen Proteinimportmaschinerie** (abgewandelt nach Hempel *et al.*, 2009 und Bullmann *et al.*, 2010)

Proteine des Apikoplasten werden im ER als Vorläuferproteine mit einer zweigeteilten, topogenen Signalsequenz (Bipartite topogenic signal sequence, BTS) synthetisiert. Mit Hilfe des Signalpeptids und dem Sec 61 Translokon in der ER-Membran gelangt das Vorläuferprotein in das ER-Lumen, wo die Spaltung des Signalpeptids erfolgt. Das verbleibende Transitpeptid vermittelt den weiteren Transport des Proteins zur sekundären Plastide. Vermutet wird ein Vesikeltransport zwischen der ER- und ersten Plastidenmembran. Der Transport über die verbleibenden drei Apikoplastenmembranen erfolgt über eine Symbionten spezifischen ERAD-ähnlichen Maschinerie (Symbiont ERAD-like machinery, SELMA) in der zweiten Membran und einem Tic 20-Homolog in der innersten Membran der Plastide. IMS: Intermembrane space, Intermembranraum; OMP85: Outer membrane protein of 85 kDa, Protein der äußeren Membran mit einer Masse von 85 kDa; PPC: Periplastid compartment, Periplastidäres Kompartiment.

Wie erfolgt nun der Transport der Proteine vom ER zur äußeren Membran einer Plastide, die von insgesamt vier Membranen umgeben ist? Da im Fall der Cryptophyten, Haptophyten und Heterokontophyten diese ein Kontinuum mit der Membran des Wirtszell ER bildet, hat das Protein sobald es im ER-Lumen vorliegt gleichzeitig die erste und somit äußerste Plastidenmembran überquert. Anders sieht es hingegen bei den beiden Apikomplexa

*Plasmodium falciparum* und *Toxoplasma gondii* aus, deren Plastide nicht im ER lokalisiert zu sein scheint. Da man bereits Vesikel mit Plastidenproteinen identifiziert und lokalisiert hat (Karnataki *et al.*, 2007; van Dooren *et al.*, 2009), ist es durchaus denkbar, dass bei beiden genannten Parasiten der Proteintransport zwischen der ER-Membran und der ersten Apicoplastenmembran über Vesikel ohne Beteiligung des Golgis stattfindet (Tonkin *et al.*, 2006). Eine weitere Möglichkeit wie Proteine die äußerste Membran passieren könnten, wären die von Tomova und Kollegen (Tomova *et al.*, 2006, 2009) identifizierten, direkten Kontaktstellen zwischen beiden Organellen. In der sekundären Plastide angelangt, bleiben noch drei weitere Membranen, die es für stromale Proteine zu überqueren gilt (Abbildung 1-5). Um die periplastidäre Membran (PPM), welche von der zweiten Membran gebildet wird, zu passieren, machen viele Mitglieder der Chromalveolaten von einem System namens „Symbiotic ERAD-like machinery“ (SELMA) Gebrauch (Hempel *et al.*, 2009). 2007 identifizierten Sommer und Kollegen diese Maschinerie in der sekundären Plastide von Cryptomonaden, Heterokontophyten und Apikomplexen und postulierten, dass es Teil der Importmaschinerie in der PPM sein könnte (Sommer *et al.*, 2007). In den darauf folgenden Jahren konnte diese Vermutung in den genannten Organismen bestätigt werden (Agrawal *et al.*, 2009; Kalanon *et al.*, 2009; Spork *et al.*, 2009). Die ER-associated protein degradation (ERAD) Maschinerie stellt in eukaryotischen Zellen normalerweise einen Teil der Qualitätskontrolle im ER dar und ist für die Retranslokation von fehlgefalteten Proteinen aus dem ER-Lumen in das Cytosol verantwortlich (Tsai *et al.*, 2002; Ye *et al.*, 2004). Dort findet anschließend der proteasomale Abbau von fehlgefalteten und ubiquitinylierten Proteinen statt.

Die zwei verbleibenden innersten Apikoplastenmembranen stellen möglicherweise Homologe zu den beiden Membranen der primären Plastide der einst phagozytierten Rotalge dar, daher ist es nicht auszuschließen, dass die darin bereits enthaltenen Proteine zu Bestandteilen der Proteinimportmaschinerie der sekundären Plastide der Chromalveolaten umfunktioniert wurden. So ist es nicht verwunderlich, dass mit Hilfe von genomischen Untersuchungen und zum Teil auch Lokalisationsanalysen in verschiedenen Gruppen der Chromalveolaten Gene und Komponenten der Tic Maschinerie identifiziert und lokalisiert werden konnten. Dies trifft z.B. für Cryptophyten, Heterokontophyten und die beiden Apikomplexen *Plasmodium falciparum* und *Toxoplasma gondii* zu (Douglas *et al.*, 2001; McFadden und van Dooren, 2004; van Dooren *et al.*, 2008; Kalanon *et al.*, 2009). Zwei Bestandteile der Tic Maschinerie, die in *Toxoplasma gondii* gefunden und näher analysiert wurden, sind TgTic20 und TgTic22. So konnten van Dooren und Kollegen zeigen, dass es sich bei TgTic20 um ein integrales Membranprotein der innersten Apikoplastenmembran

handelt, das allem Anschein nach Teil der Proteinimportmaschinerie ist und somit ein für den Parasiten essentielles Protein darstellt (van Dooren *et al.*, 2008). Eine Funktion beim Proteinimport in die sekundäre Plastide konnte auch dem zweiten identifizierten Protein, TgTic22, zugewiesen werden (Agrawal und Striepen, 2010).

Die Identifikation von Toc-Homologen in sekundären Plastiden erwies sich im Vergleich zu der der Tic-Homologen als schwieriger. So konnte zwar ein Toc34 Homolog in *Plasmodium falciparum* beschrieben werden (Waller und McFadden, 2005), jedoch weiß man bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht, welche Rolle es im Proteinimport in den Apikoplasten einnimmt. Obwohl schon seit längerem bekannt ist, dass sowohl das Nucleomorph der Chlorarachniophyte *Bigelowiella natans* als auch das Genom der Diatomee *Phaeodactylum tricornutum* für solch ein Toc75 Homolog kodiert (Gilson *et al.*, 2006; Wunder *et al.*, 2007), gelang es Bullmann und Kollegen erst 2010 ein solches Toc75 Homolog in der dritten Plastidenmembran von *P. tricornutum* nachzuweisen (Bullman *et al.*, 2010). Des Weiteren konnten sie durch bioinformatische Analysen ein solches Toc75 Homolog auch in anderen Organismen einschließlich *P. falciparum* und *T. gondii* identifizieren. Anhand der Ergebnisse der elektrophysiologischen Untersuchungen konnten sie das von ihnen in *P. tricornutum* identifizierte und lokalisierte Toc75 Homolog eindeutig der „Outer membrane protein of 85 kDa“ (OMP85) Familie zuordnen und als Bestandteil der dritten Plastidenmembran eine mögliche Beteiligung am Proteinimport zuweisen.

### 1.5 Die OMP85-Familie

Mitglieder der OMP85-Familie stellen Proteine dar, die man sowohl in Membranen vieler Bakterien als auch in den Membranen der aus ihnen hervorgegangenen, eukaryotischen Organellen vorfindet. Zusammen mit der sogenannten Zwei-Partner Sekretions (Two-Partner System, TPS) -Familie gehört die OMP85-Familie der Überfamilie der Polypeptid transportierenden  $\beta$ -barrel Proteine (Polypeptide transporting  $\beta$ -barrel proteins, PTBPs) an (Moslavac *et al.*, 2005; Saier, 2006; Schleiff *et al.*, 2011). Proteine der OMP85-Familie zeichnen sich durch zwei spezielle Domänen aus, einer sogenannten Polypeptidtransport assoziierten (POTRA)-Domäne am N-Terminus und einer  $\beta$ -Barrel Domäne am C-Terminus (Gentle *et al.*, 2005). Während manche Proteine mehrere POTRA-Domänen aufweisen wie beispielsweise das OMP85 von *Neisseria meningitidis*, so gibt es auch solche, die nur eine POTRA-Domäne besitzen. Letzteres trifft zum Beispiel für das mitochondriale Sam50 (Sorting and assembling machinery protein of 50 kDa) zu. Die POTRA-Domäne an sich enthält mehrere POTRA-Motive, wobei jedes POTRA-Motiv sich aus zwei  $\beta$ -Strängen, einer

$\alpha$ -Helix und einem weiteren  $\beta$ -Strang ( $\beta_1, \alpha_1, \alpha_2, \beta_2$  und  $\beta_3$ ) zusammensetzt (Sanchez - Pulido *et al.*, 2003; Gentle *et al.*, 2005; Jacob-Dubuisson *et al.*, 2009). Die Sequenz der POTRA-Domäne verschiedener Proteine der OMP85-Familie ist nicht konserviert, man findet lediglich einige Übereinstimmungen in Bezug auf hydrophobe Aminosäuren und Glycine (Jacob-Dubuisson *et al.*, 2009). Am aminoterminalen Ende des Proteins findet man die POTRA- im Vergleich zur  $\beta$ -Barrel Domäne nicht in die Membran integriert, sondern zwischen der inneren und äußeren Bakterienmembran, jenen Bereich, den man als Periplasma bezeichnet (Voulhoux *et al.*, 2003). Über die eindeutige Funktion dieser Domäne ist man sich bis jetzt noch nicht einig, sie könnte als Substratbindende Domäne für Interaktionen mit Proteinen oder zur Komplexbildung dienen (Sanchez-Pulido *et al.*, 2003; Ertel *et al.*, 2005; Gentle *et al.*, 2005; Bos *et al.*, 2007; Bredemeier *et al.*, 2007; Clantin *et al.*, 2007). Auch eine Chaperonähnliche Funktion wäre denkbar (Kim *et al.*, 2007).

Wie bereits erwähnt, besitzen OMP85-Proteine mit der  $\beta$ -Barrel Domäne eine weitere für sie typische Domäne. Diese befindet sich am C-Terminus und setzt sich aus 16  $\beta$ -Strängen zusammen, die in antiparalleler Richtung zueinander angeordnet sind (Gentle *et al.*, 2005). Gemeinsam bilden sie die Pore der OMP85-Proteine, über welche die Integration in die äußere Bakterienmembran erfolgt. In Abhängigkeit des Durchmessers und der Leitfähigkeit dieser Pore unterteilt man die OMP85-Familie in zwei Unterfamilien bzw. Typen. Während man die Proteine mit der geringeren Leitfähigkeit und kleinerem Porendurchmesser dem Sam50-Typ (proteobakterielle / mitochondriale OMP85-Proteine) zuordnet, weist man jene mit der größeren Leitfähigkeit und größerem Durchmesser dem Toc75-Typ (cyanobakterielle / plastidäre OMP85-Proteine) zu (Bredemeier *et al.*, 2007). Basierend auf diesen Eigenschaften üben die Proteine der OMP85-Familie verschiedene Funktionen aus. Die Proteine des Sam50-Typs sind offenbar an der Integration von Proteinen in die Membran beteiligt, wohin gegen die des Toc75-Typs vermutlich in den Transport von Proteinen über die Membran involviert sind (Bullmann *et al.*, 2010).

### 1.5.1 OMP85-Proteine in Prokaryoten

Gramnegative Bakterien besitzen eine komplexe Hülle, die sich aus zwei Membranen, einer inneren und einer äußeren, und dem dazwischen liegenden periplasmatischen Raum mit dünner Mureinschicht, zusammensetzt. Während die innere Membran größtenteils Proteine mit  $\alpha$ -Helices wie zum Beispiel Permeasen und Enzyme für die Zellwandsynthese enthält, weist die äußere Membran zahlreiche Proteine auf, die u.a. für die Sekretion von toxischen

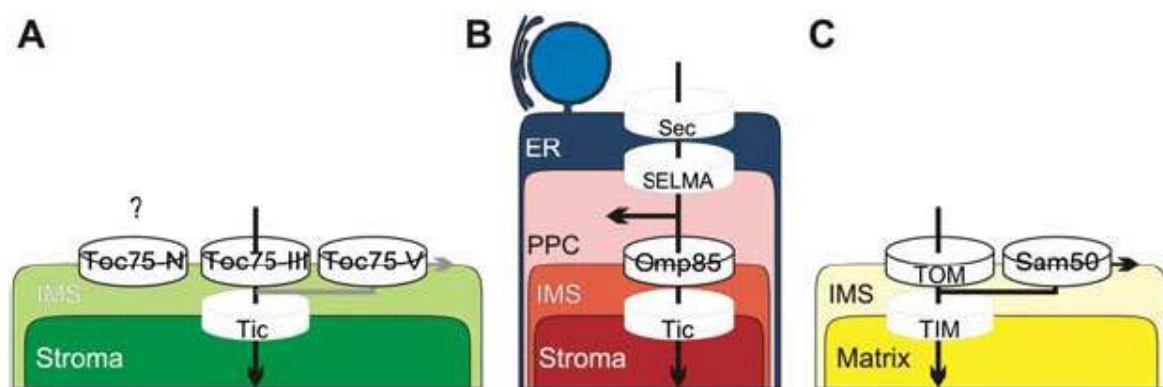
Molekülen benötigt werden, beziehungsweise Porine, die für den Import von Nährstoffen und Siderophoren zuständig sind. Unter den Proteinen der äußeren Bakterienmembran befinden sich auch integrale Membranproteine, die  $\beta$ -Barrels enthalten und der OMP85-Familie angehören. Solche Proteine sind in gramnegativen Bakterien oft an der Assemblierung, Faltung und Integration von  $\beta$ -Barrel Proteinen in die äußere Membran beteiligt (Bos *et al.*, 2007; Knowles *et al.*, 2009). Ein Beispiel für solch ein OMP85-Protein ist BamA, das in der äußeren Membran aller bis jetzt bekannten, gramnegativen Bakterien zu finden ist. BamA stellt eine Komponente der  $\beta$ -Barrel Assemblierungsmaschinerie (BAM) dar, welche die oben genannten Funktionen ausübt. In *E. coli* setzt sich der BAM-Komplex aus fünf Proteinen zusammen, YaeT (BamA), YfgL (BamB), NlpB (BamC), YfiO (BamD) und SmpA (BamE). Während das erst genannte Protein, BamA, ein integrales Membranprotein darstellt, fungieren BamB, C, D und E als akzessorische Lipoproteine (Onufryk *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2005; Misra, 2007; Sklar *et al.*, 2007; Vuong *et al.*, 2008). Als Mitglied der OMP85-Familie weist das BamA Protein zwei wichtige Komponenten auf. Es enthält als eine wichtige Komponente POTRA-Domänen, die in den periplasmatischen Raum weisen. Die zweite Komponente wird von einem  $\beta$ -Barrel am C-Terminus des Proteins gebildet, welches in die äußere Bakterienmembran integriert ist (Sanchez-Pulido *et al.*, 2003). Wie genau der Mechanismus der Faltung und des Einbaus von Membranproteinen bzw. OMPs in die äußere Bakterienmembran mit Hilfe des BAM-Komplexes abläuft, ist zum jetzigen Zeitpunkt noch unklar. Es wird jedoch vermutet, dass die im Cytoplasma synthetisierten OMPs zunächst an dort ansässige Chaperone binden und anschließend mit Hilfe des SecYeg Komplexes über die innere Bakterienmembran transportiert werden können (Knowles *et al.*, 2009). Der weitere Transport vom periplasmatischen Raum bis zur äußeren Bakterienmembran wird entweder durch den SurA- oder den Skp/DegP Pathway vermittelt, wobei es sich bei SurA, Skp und DegP um periplasmatische Chaperone handelt. An der äußeren Membran angelangt, kommt der BAM-Komplex ins Spiel. Die Erkennung und Bindung der äußeren Membranproteine wird den beiden POTRA-Domänen des BamA Proteins zugewiesen (Sanchez-Pulido *et al.*, 2003; Robert *et al.*, 2006). Das Einfädeln der Proteine in die von BamA gebildete Pore erfolgt mit Hilfe der genannten akzessorischen Komponenten und der POTRA-Domänen (Knowles *et al.*, 2009). Die anschließende Freisetzung der OMPs in die Membran könnte durch eine Dissoziation des BAM-Komplexes stattfinden.

### 1.5.2 OMP85-Proteine in Eukaryoten

Das erste Omp85 ähnliche Protein in Eukaryoten wurde 1994 von Schnell und Kollegen entdeckt (Schnell *et al.*, 1994). Dabei handelte es sich um Toc75 in der äußeren Chloroplastenmembran, das die Translokationspore des Toc-Komplexes in eben dieser Membran bildet. Ungefähr zehn Jahre später wurden weitere OMP85 ähnliche Proteine entdeckt, dieses mal handelte es sich u.a. um ein Protein in Mitochondrien (Kozjak *et al.*, 2003; Paschen *et al.*, 2003; Gentle *et al.*, 2004). Bis zum jetzigen Zeitpunkt hat man einige OMP85 ähnliche Proteine in Landpflanzen gefunden, von denen drei allem Anschein nach wichtige Funktionen in der Entstehung der Chloroplasten von Embryophyten einnehmen (Schleiff *et al.*, 2011). Bei diesen Proteinen handelt es sich um Toc75-III, Toc75-IV und Toc75-V, die man ihrer Funktionalität nach zwei verschiedenen Klassen zuordnen kann. Während die eigentliche Funktion des Toc75-IV Proteins noch ungeklärt ist, spielt das Toc75-III Protein eine zentrale Rolle im Transport von Vorläuferproteinen in die Plastide, indem es die Translokationspore in der äußeren Plastidenmembran bildet (Sommer und Schleiff, 2009). Im Vergleich dazu ist das Toc75-V Protein in der Assemblierung und Integration von  $\beta$ -Barrel Proteinen in die äußere Plastidenmembran involviert (Schleiff und Soll, 2005). OMP85 ähnliche Proteine findet man nicht nur in primären Plastiden mit zwei Membranen sondern auch in sekundären Plastiden, die unter anderem aus einer Endosymbiose einer Rotalge mit einer eukaryotischen Zelle hervorgegangen sind. Diese Art von komplexen Plastiden weisen im Vergleich zu primären Plastiden mehr als zwei Membranen auf, im Fall von Cryptophyten, Diatomeen und Apikomplexa sind es insgesamt vier. Da die Herkunft der einzelnen Membranen bereits erwähnt wurde, soll an dieser Stelle noch einmal darauf hin gewiesen werden, dass die beiden inneren Membranen homolog zu den beiden Membranen der primären Plastiden sind.

Neben den OMP85 ähnlichen Proteinen in plastidären Membranen konnte, wie bereits erwähnt, ein ähnliches Protein ebenso in der äußeren Membran der Mitochondrien identifiziert werden. Bei diesem mitochondrialen Protein handelt es sich um das sogenannte Sam50, welches einen Teil der „Sortierungs- und Assemblierungsmaschinerie“ (SAM) darstellt. Dieser Komplex ist zuständig für den Einbau und Assemblierung der im Cytosol synthetisierten  $\beta$ -Barrel Proteine in die äußere Mitochondrienmembran (Becker *et al.*, 2009; Endo und Yamano, 2009). Wie die Toc75 Proteine besitzt Sam50 ebenfalls eine C-terminale  $\beta$ -Barrel Domäne, jedoch weist es im Vergleich zu diesen am N-Terminus nur eine statt mehrere POTRA-Domänen auf. Daten von Kutik und Kollegen zufolge ist diese eine POTRA Domäne von Sam50 eine essentielle Komponente, die in der Hefe bei der Biogenese von

Mitochondrien eine zentrale Rolle spielt (Kutik *et al.*, 2008). Des Weiteren vermutet man, dass es mit importierten Vorläuferproteinen interagieren könnte (Habib *et al.*, 2007). Neben der Beteiligung an der Integration von  $\beta$ -Barrel Proteinen in die äußere Mitochondrienmembran übt Sam50 möglicherweise noch eine weitere Funktion in der Biogenese von  $\alpha$ -helikalen Transmembranproteinen aus. Welche exakte Aufgabe es dabei hat, bleibt jedoch zu klären (Schleiff *et al.*, 2011).



Schleiff *et al.*, 2011

**Abbildung 1-6: OMP85 ähnliche Proteine in eukaryotischen Organellen (primäre, sekundäre Plastiden und Mitochondrien)**

A: Schematische Darstellung einer primären Plastide eines Embryophyten mit den darin enthaltenen Toc75 Proteinen. Toc75-III repräsentiert die Translokationspore des Toc-Komplexes und ist somit Teil der Proteintransportmaschinerie, während die Funktion des Toc75-IV bzw. N Proteins noch ungeklärt ist. Toc75-V übt allem Anschein nach die gleiche Funktion aus wie das mitochondriale Protein Sam50 und ist an der Assemblierung und Integration von  $\beta$ -Barrel Proteinen in die jeweilige äußere Organellenmembran beteiligt.

B: Schematische Darstellung einer sekundären Plastide mit vier Membranen. Die in die Plastide zu importierenden Proteine gelangen mit Hilfe des Sec-Translokons in der ersten Membran und SELMA in der zweiten Membran in das PPC. Der anschließende Transport über die beiden inneren Membranen findet über ein OMP85 ähnliches Protein (vermutlich ein Toc75-III Homolog) und einem Tic-Homolog statt.

C: Schematische Darstellung eines Mitochondriums. In der äußeren Membran liegt der Tom-Komplex vor, über den die im Cytosol synthetisierten  $\beta$ -Barrel Proteine in den Intermembranraum transportiert werden können. Mit Hilfe des SAM-Komplexes, der als eine Komponente u.a. Sam50 enthält, können die genannten Proteine in die Membran integriert werden.

Betrachtet man zusammenfassend die OMP85 ähnlichen Proteine in eukaryotischen Organellen, die aus prokaryotischen, einst frei lebenden Organismen hervorgegangen sind, so lässt sich folgende Aussage treffen: Es finden sich OMP85 ähnliche Proteine sowohl in Membranen von primären und sekundären Plastiden als auch in der von Mitochondrien (Abbildung 1-6). Toc75-V und Sam50 haben die ursprüngliche, bakterielle Funktion (beteiligt an der Assemblierung und Integration von  $\beta$ -Barrel Proteinen) beibehalten (Sommer *et al.*, 2011), während Toc75-III zur Translokationspore des Toc-Komplexes umfunktioniert wurde

und somit eher am Transport als an der Integration von  $\beta$ -Barrel Proteinen beteiligt ist (Arnold *et al.*, 2010).

### 1.6 Zielsetzung

Die meisten intrazellulären Parasiten, die dem Stamm der Apikomplexa angehören, beherbergen ein plastidenähnliches Organell, das von vier Membranen umgeben ist und als Apikoplast bezeichnet wird. Aufgrund von horizontalem Gentransfer befinden sich die meisten seiner Gene im Wirtszellkern, weshalb die von ihnen kodierten Proteine posttranslational in die Plastide importiert werden müssen. Die Identifikation einiger Komponenten der Proteintransportmaschinerie trug zum Verständnis des Transportvorganges in den Apikoplasten bei, jedoch ist es bis zum jetzigen Zeitpunkt noch ungeklärt, wie der Transport über die dritte Plastidenmembran erfolgt. Einen möglichen Aufschluss in Bezug auf diese Frage lieferte die Arbeit von Bullmann und Kollegen (Bullmann *et al.*, 2010). So konnten diese ein Protein der OMP85-Familie, PtOMP85, in der dritten Plastidenmembran der sekundären Plastide von *P. tricornutum*, einer Diatomee, die wie die Apikomplexa zu den Chromalveolaten gehört, identifizieren und lokalisieren. Diesem Protein konnte anhand von elektrophysiologischen Analysen eine mögliche Funktion als Translokationspore in der dritten Plastidenmembran zugeordnet werden. Des Weiteren konnten sie OMP85-Homologe durch bioinformatische Analysen in weiteren Organismen wie *Toxoplasma gondii* und *Plasmodium falciparum* identifizieren.

Ziel dieser Arbeit war es, das von Bullmann durch bioinformatische Analysen im Genom von *Toxoplasma gondii* identifizierte OMP85-Homolog, TgOMP85, im Parasiten zu lokalisieren und zu charakterisieren. Befindet sich dieses Protein im Apikoplasten, so gilt es mit Hilfe des „Self-Assembling Split GFP“ Systems zu bestimmen, in welcher der insgesamt vier Membranen dieses Protein lokalisiert ist und welche Topologie es aufweist. Eine dazu alternative Methode, die bei Bedarf durchgeführt werden soll, ist eine elektronenmikroskopische Analyse bzw. Lokalisation mit einem spezifisch gegen TgOMP85 generierten Antikörper. Der Einsatz des Elektronenmikroskops soll, wenn möglich, eine exaktere, subzelluläre Lokalisation des genannten Proteins ermöglichen. Lässt sich die Lokalisation von TgOMP85 in der sekundären Plastide von *Toxoplasma gondii* bestätigen, gilt es durch das Durchführen verschiedener Extraktionsmethoden anhand verschiedener Detergenzien und dem Einsatz des generierten Antikörpers die Membranassoziation von TgOMP85 näher zu untersuchen. Darüber hinaus soll die Funktion von TgOMP85 charakterisiert und überprüft werden, ob es sich um ein für *Toxoplasma gondii* essentielles Protein handelt. Dazu müsste das endogene TgOMP85 Gen zunächst durch ein Tetrazyklin



regulierbares TgOMP85 Gen ersetzt werden. Durch Ausschalten des regulierbaren Gens soll überprüft werden, ob weiterhin ein Proteintransport in den A pikoplasten stattfindet beziehungsweise, ob die Parasiten weiterhin viabel sind. Durch die heterologe Expression des mit einem His-Tag versehenen TgOMP85 Proteins und einer anschließenden Aufreinigung und Integration in künstliche Membranen sollten zudem die elektrophysiologischen Eigenschaften des zu untersuchenden Proteins näher analysiert werden, um eine Zuordnung zum Toc75- oder Sam50-Typ der OMP85-Familie zu ermöglichen. Mit Hilfe dieser Eigenschaften könnte eine detailliertere Aussage über mögliche Funktionen von TgOMP85 getroffen werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Produktbezeichnung	Hersteller
Agarosegelkammern	Gibso, BRL
Äkta Prime FPLC	GE Healthcare
Blotting Apparatur	Phase
BTX ECM 630, Electro Cell Manipulator	Harvard Apparatus
Exposure cassette	Rego
Feinwaage 2414	Sartorius
French Pressure Cell Press	American Instrument Company
Gel doc system	Intas
Geltrockner	Biotec, Fischer
Gene pulser II	Biorad
Ice machine (AF-20)	Scotsman
CO <sub>2</sub> Water Jacketed Incubator	NUAIRE™US Auto Flow
Kühlzentrifuge Mikro 22R	Hettich
Laborroller Spiramax5	Denley
Magnetrührer Combimag RCH	IKA
MonoQ Säule	GE Healthcare
Nanodrop	Peqlab
pH-Meter	Calimatic, Greisinger electronic GmbH
PowerPac basic Powersupply	Biorad
Roller mixer	Neolab
S2100 Diode Array Spectrophotometer, WPA, biowave	Biochrom
Sterilbank, HERA Safe	Thermo Scientific

Superdex 200 HR 10 / 30 Säule	GE Healthcare
T-personal PCR cycler	Biometra
Thermoblock	Stuart Scientific
Thermomixer 5436	Eppendorf
Vista vision microscope	VWR
Vortexer Vortex-genie 2	Scientific industries
Waage P1200	Mettler
Waage 1205 MP	Sartorius
Wasserbad	Köttermann
Wippschüttler Duomax 1030	Heidolph
Optima <sup>TM</sup> L-90K Ultracentrifuge	Beckman Coulter
Zeiss Cell Observer.1	Zeiss
Zellkulturmikroskop	Leitz Wetzlar

### 2.1.2 Glaswaren und Verbrauchsmaterialien

Produktbezeichnung	Hersteller
Cryotubes	Sarstedt
Deckgläschen, runde	Roth
Elektroporationsküvetten	Biorad, Peqlab
Eppendorf-Reaktionsgefäße	Eppendorf
Erlenmeyerkolben	Kobe
Gel loader tips	VWR
Glasflaschen	Schott
Glasobjektträger	VWR
Kanülen	Braun, Roth
Medical X-ray films RX NIF	Fuji

## 2 Material und Methoden

Nitrocellulosemembran	Schleicher & Schuell
Pasteurpipetten	Brand GmbH
Petrischalen	Greiner, VWR
Pipetten	VWR
Pipettenspitzen	Sarstedt
Plastikmaterialien	Sarstedt
Reaktionsgefäße (0.2ml, 0.5ml, 1.5ml, 2ml, 15ml, 50ml)	Sarstedt
Spritzen mit Luer-Lock Verschluss	Braun
Tubing-to-Luer-Lock Säulen mit Filter (Ø 35 µm) und Stopfen	Mobicol
Ultrazentrifugen Röhrchen	Beckman Coulter
Whatman-Papier	Schleicher & Schuell

### 2.1.3 Chemikalien

Produktbezeichnung	Hersteller
1 kb+ DNA ladder	Invitrogen
1,4-dithio-DL-threitol (DTT)	Roth
Adenosintriphosphat	Sigma
Agar	Roth
Agarose (Molecular Biology Grade)	Eurogentec
Ammoniumhydroxid	Roth
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth
Ammoniumsulfat ((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Roth
Bovine serum albumin fraction V (BSA)	PAA
Bromophenolblau	Amersham Biosciences
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Roth
Chitin Magnetic Beads	New England Biolabs

## 2 Material und Methoden

---

Chloramphenicol	Sigma-Aldrich
Chloroform	Roth
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
Dikaliumphosphat ( $K_2HPO_4$ )	Roth
Dinatriumphosphat ( $Na_2HPO_4$ )	Roth
Ethylendiamintetra-acetic acid (EDTA)	Roth
Ethanol p.a. (EtOH)	Roth
Ethidiumbromid (EtBr)	Roth, Sigma Aldrich
Fluoromount-G	Southern Biotech
Glacial acetic acid	Roth
Glutaraldehyd	Roth
Glutathion (GSH)	Roth
Glycerol anhydrous	Applichem
Glycin	Roth
Guanidinhydrochlorid	Applichem, Roth
Hefeextrakt	Roth
HEPES	Applichem
Hoechst 3325	Molecular probes
Hydrogenperoxid ( $H_2O_2$ )	Merck
Hydrochinon	Applichem
Imidazol	Applichem
IPTG	Roth
Isopropanol	Roth
Kaliumacetat ( $C_2H_3KO_2$ , KoAc)	Applichem
Kaliumbromid (KBr)	Applichem
Kaliumchlorid (KCl)	Roth

Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	Roth
Kanamyzin	Roth
Kresolrot	Sigma
Kaliumhydroxid (KOH)	Roth
LB-Agar (Lennox)	Roth
Luminol	Applichem
Magnesiumchlorid ( $\text{MgCl}_2$ )	Roth
Magnesiumsulfat ( $\text{MgSO}_4$ )	Roth
Methanol	Roth
Metol	Roth
Milchpulver	Roth
Natriumacetat ( $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$ , NaOAc)	Roth
Natriumcarbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )	Roth
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Applichem
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck
Natriumsulfit ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ )	Roth
Ni-NTA Agarose	Qiagen
NNN'-N-tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth
PageRuler prestained protein ladder	Fermentas
p-Coumarsäure	Roth
Paraformaldehyd	Sigma Aldrich
Pepton	Roth
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1)	Roth
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Serva

## 2 Material und Methoden

---

Ponceau S	Roth
Protease Inhibitor Cocktail Set III	Calbiochem
Rotisolv ®HPLC Gradient Grade Water	Roth
Rotiphorese®Gel 30	Roth
Salzsäure (HCl) 37%	Roth
SOB- Medium	Roth
Sucrose	Roth
Talon Superflow Metal Affinity Resin	Clontech
Trichloressigsäure (TCA)	Roth
Tris	Applichem, Roth
Triton X-100	Roth
TRIzol Reagenz	Invitrogen
Urea	Roth
Wasser (steril, pyrogen-frei)	Roth

### 2.1.4 Enzyme

Produktbezeichnung	Hersteller
DNase	Applichem
<i>EcoRI</i>	New England Biolabs
KOD DNA Polymerase	Novagen
<i>NotI</i>	New England Biolabs
<i>NsiI</i>	New England Biolabs
<i>PacI</i>	New England Biolabs
Pfu-Polymerase	Fermentas
RNase	Applichem

## 2 Material und Methoden

---

Superscript II Reverse Transkriptase	Invitrogen
T4 DNA Ligase	Invitrogen
Taq Polymerase	New England Biolabs

### 2.1.5 Molekularbiologische Kits

Produktbezeichnung	Hersteller
CloneJet™ PCR cloning kit	Fermentas
Gelextraktionskit	Seqlab
Miniprep Plasmid Kit	Peqlab
PCR Aufreinigungskit	Seqlab
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Qiagen
Super Script III One Step RT-PCR Platinum Taq HiFi	Invitrogen
Zero Blunt® TOPO® PCR cloning kit®	Invitrogen

### 2.1.6 Zellkulturmaterialien

Produktbezeichnung	Hersteller
DMEM (high glucose, 4,5 g/l)	PAA
Fötales Kälberserum (FCS)	Invitrogen
L-Glutamin (200mM) mit Penicillin und Streptomycin (100x)	PAA
Mykophenolsäure	Sigma Aldrich
Trypsin EDTA	PAA
Anhydrotetrazyklin (ATc)	Clontech
Xanthin	Sigma Aldrich

Die für die Zellkultur verwendeten Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen Brand GmbH, Greiner und Sarstedt bezogen.



### 2.1.7 Antikörper

#### 2.1.7.1 Erstantikörper

Produktbezeichnung	Hersteller
Huhn anti GFP (1: 2000 für eine Immunfluoreszenz)	Jackson Immuno Research Laboratories
Kaninchen anti HA (1:50 für eine Immunfluoreszenz)	Sigma-Aldrich
Kaninchen anti V5 (5 µg/ml für eine Immunfluoreszenz)	Sigma-Aldrich
Goat anti GST (1:2000)	GE Healthcare
Maus anti GST (1:1000)	Sigma- Aldrich
Maus anti His (1:3000 – 1:5000)	Qiagen
Maus anti-Ty (1:20 für eine Immunfluoreszenz 1: 500 für einen Western-Blot)	Prof. Keith Gull
Maus anti SAG (1:200)	Dr. Hosam Shams-Eldin

Wenn nichts anderes aufgeführt ist, beziehen sich die hier genannten Verdünnungen der jeweiligen Erstantikörper auf die in einem Western-Blot verwendete Verdünnung.

#### 2.1.7.2 Zweitantikörper für Immunfluoreszenzen

Produktbezeichnung	Hersteller
Cy2 Ziege anti Kaninchen	Jackson Immuno Research Laboratories
Cy2 Ziege anti Maus	Jackson Immuno Research Laboratories
Cy3 Ziege anti Kaninchen	Jackson Immuno Research Laboratories
Cy3 Ziege-anti-Maus	Jackson Immuno Research Laboratories

Die hier aufgeführten Zweitantikörper wurden jeweils in einer 1:2000 Verdünnung eingesetzt.

### 2.1.7.3 Zweitantikörper für Western-Blots

Produktbezeichnung	Hersteller
Huhn anti Maus HRP	Santa Cruz
Kaninchen anti Ziege HRP	Dako
Schwein anti Kaninchen HRP	Dako
Ziege anti Maus HRP	Dako
Ziege anti Kaninchen HRP	Dakoi

Die hier aufgeführten Zweitantikörper wurden jeweils in einer 1:2000 Verdünnung eingesetzt.

## 2.2 Zellen und Organismen

### 2.2.1 Humane Zellen und Parasitenstämme

Humane Zelllinie	Quelle
Humane Vorhautfibroblasten (Human foreskin fibroblasts, HFF)	Dr. M. Meissner
Vero-Zellen (Nierenzellen grüner Meerkatzen)	Dr. Hosam Shams-Eldin

Parasitenstämme	Quelle
RH <i>hxgprt</i>	Dr. M. Meissner
TaTi	Dr. M. Meissner
▲ <i>ku80</i>	Prof. Vern Carruthers

### 2.2.2 Bakterienstämme

Bakterienstamm ( <i>E. coli</i> )	Quelle
BL21 (DE)	Stratagene
BL21-Codon Plus RIL	Stratagene
BL21-Rosetta	Stratagene
DH5α	Invitrogen

NiCo21	New England Biolabs
TOP10	Invitrogen
XL-Blue	Stratagene
XL-Gold	Stratagene

### 2.3 Vektoren

Plasmid	Resistenzen	Hersteller
pASK-IBA16 Vektor	Ampicillin	IBA Bio TAGnology
pCR <sup>®</sup> Blunt II-TOPO <sup>®</sup> -Vektor	Kanamycin	Invitrogen
pGEX-5x-3 Vektor	Ampicillin	GE Healthcare
pJet 1.2 Vektor	Ampicillin	Fermentas
pQ30 Vektor	Ampicillin	Qiagen
pQE30UA Vektor	Ampicillin	Qiagen
TUB8mycGFPMyoATy-HX_117(V117)	Ampicillin Mycophenolsäure/Xanthin	Dr. Markus Meissner
T7Sag4HXGPRT (V112)		Dr. Markus Meissner

### 2.4 Oligonukleotide

#### 2.4.1 Primer für Tags

HA-Tag

Name	Restriktionsenzym	Sequenz (5'→3')
FP_NsiI_3xHA	<i>NsiI</i>	CCATGCATTACCCGTACGAC
RP_PacI_3xHA-Ta	<i>PacI</i>	GGTTAATTAATTAGAGCTCGGC

mCherry

Name	Restriktionsenzym	Sequenz (5'→3')
mChEXA-F	<i>EcoRI-XhoI-AvrII</i>	CCGAATTCCTCGAGCCTAGGATGGTGGCAA GGGCGAGG
mCh-P-R	<i>PacI</i>	GGT TAA TTA ATT ACT TGT ACA GCT CGT CCA TGC

### Self-Assembling Split GFP

Name	Restriktionsenzym	Sequenz (5'→3')
SAGFP1-10-Nsil-F	<i>NsiI</i>	CCATGCATATGGGTGGCACTAGTAGC
SAGFP1-10-PacI-R	<i>PacI</i>	GGTTAATTAATTAGGTACCCTTTTCGTTGGGATC
SAGFP11-Nsil-F	<i>NsiI</i>	CCATGCATATGGGATCCGGTGGAGGGTC
SAGFP11_PacI-R	<i>PacI</i>	GGTTAATTAATTATGTAATCCCAGCAGCATTAC

### 2.4.2 Primer für Sequenzierungen:

Name	Sequenz (5'→3')
FP_V117_1101	GGCTTGTGTGAAGTTCTTGCGGAAAAC
TgOMP85_121seq	GCAACTGAAGCGGATCTTTTCGCGG
RP_V117_2100	GGGCAAGCCACAGCGGAACAACCTCAG
TgOMP85_3301seq	CCTCGTCTCTCCCTCTGCGCCTTTCC
TgOMP85_3781seq	CTCGGAGGCGGCACCGCTCGTCTTCCC
OMP85_4167	CGCCTAGCGTTGCTGAGC
Pr.seqII Pr.1+2	CGTCGGTCTGCTTCGCCTTCTCCAGGT
pGEX-5x-3-FP.se	ATGTCCCCTATACTAGGTTATTG
pGEX-5x-3-RP.se	GCTGCATGTGTCAGAGGTTT
Primerseq1+2	CGCGCAATCGACCTCCGTGGAACACGACGC
pQE-30_for	CCAAGAGGAGAAATTAACCTATGAGAGGAT
pQE-30_rev	GGATTCTCACCAATAAAAAACGCCCGGCG
FP_POT_pGEX_E	CCGAATTCCCCCGCCCCTCTCACGCATCG
RP_POT_pGEX_N	CCGCGGCCCGCAGAGGACTTGGATGAAGC

### 2.4.3 Primer für Klonierungen von Parasitengen

#### Primer für die Konstrukte des TGME49\_072390 Gens (TgOMP85)

1-78 aa (TgOMP85<sup>78-Ty</sup>)

Name	Restriktionsenzym	Sequenz (5' → 3')
Tg_BTS_EcoRI_fo	<i>EcoRI</i>	CCGAATTCATGGCGGAGGAAGAAAGAC
TgOmp_78_NsiI_R	<i>NsiI</i>	CCATGCATAGAACTGGAGAAGACCC

1-95 aa (TgOMP85<sup>95-Ty</sup>)

Name	Restriktionsenzym	Sequenz (5' → 3')
Tg_BTS_EcoRI_fo	<i>EcoRI</i>	CCGAATTCATGGCGGAGGAAGAAAGAC
TgOmp_95_NsiI_R	<i>NsiI</i>	CCATGCATAAGAGGGGCGGGGGTGC

TgOMP\_BTS(TgOMP85<sup>277-Ty</sup>)

Name	Restriktionsenzym	Sequenz (5' → 3')
Tg_BTS_EcoRI_fo	<i>EcoRI</i>	CCGAATTCATGGCGGAGGAAGAAAGAC
TgompBTS_e_n_rev	<i>NsiI</i>	CCATGCATTACGATATCCACGAAGGTACG

1-512 aa (TgOMP85<sup>512-Ty</sup>)

Name	Restriktionsenzym	Sequenz (5' → 3')
Tg_BTS_EcoRI_fo	<i>EcoRI</i>	CCGAATTCATGGCGGAGGAAGAAAGAC
RP_I_	<i>NsiI</i>	CC ATG CAT A AAC TGC GTC GTC TGT CGT CTG

1-790 aa (TgOMP85<sup>790-Ty</sup>)

Name	Restriktionsenzym	Sequenz (5' → 3')
Tg_BTS_EcoRI_fo	<i>EcoRI</i>	CCGAATTCATGGCGGAGGAAGAAAGAC
RP_II_	<i>NsiI</i>	CCATGCATAGCCTGCGAACGACGACGACGCTC

Volle Länge (TgOMP85<sup>Ty</sup>)

Name	Restriktionsenzym	Sequenz (5' → 3')
Tg_BTS_EcoRI_fo	<i>EcoRI</i>	CCGAATTCATGGCGGAGGAAGAAAGAC
TgOMP_full_nsi_rev	<i>NsiI</i>	CCATGCATTGAAGCTGTTGTCTGGCCACG
Lars2rev		CGAAGCCCCAGGTCGGCGCCAACC
Lars3for		GGTTGGCGCCGACCTGGGGCTTCG
Lars3rev		CGAGCTTGCGAGGAACCGACGTCTGTC
Lars4for		GACAGACGTCTGGTTCTCGCAAGCTCG
T.g.Omp1for		ACAGACGACAGACGACGCAG
T.g.Omp1rev		CAGACGACAGACGACGCAG
TgOmp2rev		GCCTGCGAACGACGACGCCT
TgOmp5nestfor		CAG ACG TCG GTT CCT CGC AAG C
T.g.OMP_7nest_rev		CAGCATCTCCAGGGAGGCA
T.g.Omp9_for		GTTGGCGCCGACCTGGGGCT
Tgomp_check_rev		CCAGGGAACTGGAGAAGACCCCC

**Primer für das TGME49\_076910 Gen (TgERD2)**

TgERD2SS (Signalsequenz, SS)

Name	Restriktionsenzym	Sequenz (5' → 3')
TgERD2-E-F	<i>EcoRI</i>	CCGAATTCATGGCGATGAATGCCTTTCGT TTCGC
TgERD2-SS-X-R	<i>XhoI</i>	GGCTCGAGCTCCTGCATGCGGCATGAGA TC

TgERD2 Volle Länge

Name	Restriktionsenzym	Sequenz (5' → 3')
TgERD2-E-F	<i>EcoRI</i>	CCGAATTCATGGCGATGAATGCCTTTCGT TTCGC
TgERD2-X-R	<i>XhoI</i>	GGCTCGAGCACTTCTGCGTGGACGGGCA AC

**Primer für das TGME49\_005570 Gen (TgSam50)**

Name	Restriktionsenzym	Sequenz (5' → 3')
TgSam50_Foward	<i>EcoRI</i>	CCGAATTCATGGCGGGGTCAGCTCC
TgSam50_Reverse	<i>NsiI</i>	GGATGCATACTACTCGGGGAGTCTTCC
TgSam50_925-942		ACGCTCGACCGTCTGGAC
TgSam50_934-951		AACTCAGCCTCTGAAGGC

**Primer für das TGME49\_098990 Gen (TgFNR)**

TgFNR 1-150 aa

Name	Restriktionsenzym	Sequenz (5' → 3')
TgFNR-EcoRI-F	<i>EcoRI</i>	CCGAATTCATGGTTCTGGGGCATCCGTCC
TgFNR-150-NsiI-R	<i>NsiI</i>	CCATGCATTGGATGTTTGGTCGGTCGG

**Primer für das *T. gondii* apicoplast cell division cycle 48 protein**

TgCdc48 1- 256 aa

Name	Restriktionsenzym	Sequenz (5' → 3')
TgCDC48ap-Eco-F	<i>EcoRI</i>	CCGAATTCATGGGGACTGCGTGTTGCC TC
TgCDC48ap-NsiI-R	<i>NsiI</i>	CCATGCATAATCTCTTGCATGCGACCCTT TC

## 2.4.4 Primer für Gene, die in Expressionsvektoren kloniert wurden

### 2.4.4.1 TgOMP85<sup>91-259His</sup>

Primer TgOMP85<sup>91-259His</sup> (zur Klonierung in den pQE30 UA Expressionsvektor)

Name	Restriktionsenzym	Sequenz (5'→3')
TO85_PR1_QE30_F	_____	CCCCGCCCCTCTCACGCATCG
TO85_PR1_QE30_R	_____	TTAGAGGACTTGGATGAAGCGGCG

### 2.4.4.2 TgOMP85 Volle Länge

Primer für TgOMP85 volle Länge (zur Klonierung in den pQE30 UA Expressionsvektor)

Name	Restriktionsenzym	Sequenz (5'→3')
TgOMP85_PQE30_F	_____	CCTGGTCTCTACTACGCAC
TgOMP85_PQE30_R	_____	TTTGAAGCTGTTGTCTGGCCACGC

Primer für TgOMP85 volle Länge (zur Klonierung in den pQE30 Expressionsvektor)

Name	Restriktionsenzym	Sequenz (5'→3')
VL_pQE30_Hind_f	<i>HindIII</i>	CCAAGCTTCTCTACTACGCACAGCGACA G
VL_pQE30_Hind_r	<i>HindIII</i>	GGAAGCTTGAAGCTGTTGTCTGGCCACGC C

Primer für TgOMP85 volle Länge (zur Klonierung in den pGEX-5x-3 Expressionsvektor)

Name	Restriktionsenzym	Sequenz (5'→3')
OVL_pGEX-Eco_f	<i>EcoRI</i>	CCGAATTCCGACAGGAAGCGTCGCAC
OVL_pGEX-NotI_r	<i>NotI</i>	CCGCGGCCGCGAAGCTGTTGTCTGGC

Alle aufgeführten Oligonukleotide sind von der Firma Eurofins MWG Operon synthetisiert worden.

## 2.4.5 Plasmide für Kolokalisationszwecke

### Plasmid

PHxftsH:2V5 Ftsh 2HA@233  
 PHxftsH:2V5 Ftsh 2HA@325  
 PHxftsH:2V5 Ftsh 2HA 932-950  
 PHX APT1: APT-4HA  
 TgHsp60-RFP

### Quelle

Dr. Marilyn Parsons  
 Dr. Marilyn Parsons  
 Dr. Marilyn Parsons  
 Dr. Marilyn Parsons  
 Dr. Markus Meissner

## 2.5 Puffer und Lösungen

### 2.5.1 Puffer und Lösungen für biochemische und molekularbiologische Experimente

<u>Alkalischer Phosphatase-Puffer</u> 100mM Tris-HCl, pH 9,5 100mM NaCl 5mM MgCl <sub>2</sub>	<u>Ammoniumperoxodisulfat (APS)</u> 10% (w/v) in dd H <sub>2</sub> O
<u>Ampicillin</u> 50 mg/ml in H <sub>2</sub> O	<u>BCIP</u> 5% BCIP in 100% Dimethylformamid
<u>Blocklösung – IFA</u> 5% (w/v) Bovines Serumalbumin in PBS, pH 7.4	<u>Blocklösung – Western Blot</u> 5% Milchpulver in PBS, pH 7.4
<u>Colloidale Comassie Färbelösung</u> 0,08% (w/v) Comassie Brilliant Blue G250 (CBB G250) 1,6% (v/v) Ortho-Phosphorsäure 8% (w/v) Ammoniumsulfat 20% (v/v) Methanol	<u>Colony Mix (6 ml)</u> 1 ml Kresolrotlösung 600 µl Taq run Puffer 10 x 120 µl dNTPs 10 mM 4,28 ml steriles H <sub>2</sub> O
<u>DNA Ladepuffer 6X</u> 1% Bromphenolblau 30% Glycerol 50 mM Tris/HCl, pH 8 5 mM EDTA	<u>Elektrophorese Laufpuffer</u> 124 mM Tris 960 mM Glycin 0,05% SDS
<u>Enhanced Chemoluminescence (ECL)</u> <u>Lösung</u> 5 mM Luminol 0.8 mM p-Coumarsäure 200 mM Tris/HCl, pH 8,5	<u>Entwickler (X-ray)</u> 6.4 mM Metol 80 mM Hydrochinon 571 mM Natriumsulfit (Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> ) 452 mM Natriumkarbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ) 34 mM Kaliumbromid (KBr)
<u>Fixierungspuffer – IFA</u> 4% Paraformaldehyd in PBS, pH 7,4	<u>Karbonatpuffer, pH 11</u> 100 mM Natriumkarbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ) 1 mM EDTA



## 2 Material und Methoden

<u>Kresolrotlösung</u> 0.1 g o-Kresolsulfonephtalein 60% Sucrose	<u>NBT</u> 5% NBT in 70% Dimethylformamid
<u>Permeabilisierungspuffer – IFA</u> 0.5% Triton X-100 in PBS, pH 7,4	<u>Phosphate buffered saline (PBS), pH 7,4</u> 140 mM Natriumchlorid (NaCl) 2.7 mM Kaliumchlorid (KCl) 1.4 mM Monokaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) 0.8 mM Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )
<u>Ponceau S Färbelösung</u> 0.2% Ponceau S 3% Trichloressigsäure	<u>Probenpuffer 2X (für Proteine)</u> 100 mM Tris/HCl, pH 6,8 5 mM EDTA 20% Glycerol 4% SDS 0.2% Bromphenolblau 100 mM Dithiothreitol
<u>Sammelgelpuffer 4X (SDS-PAGE), pH 6,8</u> 500 mM Tris/HCl, pH 6,8 0.4% SDS	<u>TAE 50X</u> 2 M Tris 2 M Acetat 50 mM EDTA
<u>TaqPuffer 10X</u> 200 mM Tris/HCl, pH 8,8 100 mM Kaliumchlorid (KCl) 100 mM Ammoniumsulfat 20 mM Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> ) 1% Triton X-100	<u>TE pH 8.0</u> 10 mM Tris/HCl, pH 8,0 1 mM EDTA
<u>Trenngelpuffer 4X (SDS-PAGE)</u> 1.5 M Tris/HCl, pH 8,8 0.4% SDS	<u>Tris buffered saline (TBS)</u> 10 mM Tris/HCl, pH 7,4 140 mM Natriumchlorid (NaCl)
<u>Tris buffered saline (TBS) + TX-100</u> 10 mM Tris/HCl, pH 7,4 140 mM Natriumchlorid (NaCl) 0,005% (v/v) Triton X-100	<u>Western Blot Transferpuffer</u> 48 mM Tris/HCl, pH 9,5 39 mM Glycin 0.04% SDS 20% Methanol

### 2.5.2 Puffer für die Aufreinigung von His-getaggtten Proteinen unter nativen Bedingungen

<u>Lysepuffer (1l)</u> 50 mM Natriumdihydrogenphosphat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) 300 mM Natriumchlorid (NaCl) 10 mM Imidazol Das Einstellen des pH-Wertes auf 8,0 sollte mit Natriumhydroxid (NaOH) erfolgen.	<u>Waschpuffer (1l)</u> 50 mM Natriumdihydrogenphosphat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) 300 mM Natriumchlorid (NaCl) 20 mM Imidazol Das Einstellen des pH-Wertes auf 8,0 sollte mit Natriumhydroxid (NaOH) erfolgen.
<u>Elutionspuffer (1l)</u> 50 mM Natriumdihydrogenphosphat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) 300 mM Natriumchlorid (NaCl) 250 mM Imidazol Das Einstellen des pH-Wertes auf 8,0 sollte mit Natriumhydroxid (NaOH) erfolgen.	

### 2.5.3 Medien für die Kultivierung von *E. coli*

<u>LB (Luria-Bertani)-Agar</u> 35 g/l LB Agar	<u>LB (Luria-Bertani)-Medium</u> 10 g/l Trypton (Pepton) 5 g/l Hefeextrakt 10 g/l Natriumchlorid (NaCl) Das Einstellen des pH-Wertes auf 7,5 sollte mit Natriumhydroxid (NaOH) erfolgen.
<u>SOB Medium</u> 20 g/l Pepton 5 g/l Hefeextrakt 10 mM Natriumchlorid (NaCl) 2.5 mM Kaliumchlorid (KCl) 20 mM Magnesiumchlorid	<u>SOC Medium</u> SOB Medium 20 mM Glucose

## 2 Material und Methoden

<u>Super broth Medium</u> 35 g/l Trypton 20 g/l Hefeextrakt 5 g/l Natriumchlorid (NaCl) 5 ml/l Natriumhydroxid Das Einstellen des pH-Wertes auf 7,0 sollte mit Natriumhydroxid (NaOH) erfolgen.	
--	--

### 2.5.4 Medien und Lösungen für die Kultivierung von *Toxoplasma gondii*

<u>Cytomix</u> 10 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,6 120 mM KCl 0,15 mM CaCl <sub>2</sub> 5 mM MgCl <sub>2</sub> 25 mM HEPES, pH 7,6 2 mM EGTA, pH 7,6 Das Einstellen des pH-Wertes auf 7,6 sollte mit Kaliumhydroxid (KOH) erfolgen.	<u>DMEM</u> 445 ml DMEM (high glucose, 4,5 g/l) 50 ml FBS 5 ml L-Glutamin (200 mM) mit Penicillin und Streptomycin (100x)
<u>Einfrierlösungen</u> 50% FBS Lösung: 25 ml FBS mit 25 ml DMEM+L-Glutamin+Penicillin und Streptomycin vermischen  20% DMSO: 10 ml DMSO mit 40 ml DMEM+L-Glutamin+Penicillin und Streptomycin vermischen	<u>Mycophenolsäure</u> 25 mg/ml Stock In Ethanol lösen  <u>Xanthin</u> 50 mg/ml Stock In 1M NaOH lösen

### 2.5.5 Datenbanken und Software

4peaks	Mekentosj.com
Biochemistry –online (zur Berechnung der Ladung eines Proteins)	<a href="http://molbiol-tools.ca/Protein_Chemistry.htm">http://molbiol-tools.ca/Protein_Chemistry.htm</a>

BLAST	<a href="http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
Chromas	<a href="http://www.technelysium.com.au/chromas.html">http://www.technelysium.com.au/chromas.html</a>
ClustalW	<a href="http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html">http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html</a>
Expasy	<a href="http://expasy.org/">http://expasy.org/</a>
ImageJ v 1.39	<a href="http://rsb.info.nih.gov/ij/">http://rsb.info.nih.gov/ij/</a>
Kyte-Doolittle Hydropathy Plot (Kyte & Doolittle, 1982)	<a href="http://gcat.davidson.edu/DGPB/kd/kyte-doolittle.htm">http://gcat.davidson.edu/DGPB/kd/kyte-doolittle.htm</a>
NEBcutter V2.0	<a href="http://tools.neb.com/NEBcutter2/">http://tools.neb.com/NEBcutter2/</a>
PATS (Zuegge <i>et al.</i> , 2001)	<a href="http://gecco.org.chemie.uni-frankfurt.de/pats/calc_prot_seq.php">http://gecco.org.chemie.uni-frankfurt.de/pats/calc_prot_seq.php</a>
SignalP (Nielsen <i>et al.</i> , 1997)	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-3.0/">http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-3.0/</a>
ToxoDB	<a href="http://www.toxodb.org/">http://www.toxodb.org/</a>

## 2.6 Methoden

### 2.6.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.6.1.1 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) nach Saiki (Saiki *et al.*, 1988)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist eine molekularbiologische Methode zur Amplifizierung eines kurzen, definierten DNA-Abschnittes. Durch den Einsatz von synthetischen Oligonukleotiden (Primer), die komplementär zu dem 5'- und 3'-Ende des zu vervielfältigenden DNA-Bereichs sind, wird mit dieser Methode das DNA-Template exponentiell amplifiziert. Dabei ist auf ähnliche Schmelztemperaturen ( $T_m$ ) der Primer zu achten. Die PCR basiert auf zyklischen, sich in ihrer Temperatur unterscheidenden Reaktionsschritten, die im Wesentlichen aus der Denaturierung der doppelsträngigen DNA, der Bindung der spezifischen Primer und der Elongation bzw. der Synthese des zu amplifizierenden DNA-Bereichs durch eine hitzestabile DNA-Polymerase besteht. Soll die mit dieser Methode vervielfältigte DNA im Anschluss zu Klonierungszwecken verwendet werden, so ist darauf zu achten, dass man eine DNA-Polymerase mit sogenannter Proofreading Funktion, wie beispielsweise die KOD Hot Start Polymerase oder Pfu Polymerase, wählt. Folgt jedoch nur eine Kolonie PCR zur Überprüfung einer Integration des DNA-Abschnittes bzw. Inserts in ein Plasmid, so kann auch eine DNA-Polymerase ohne die genannte Funktion verwendet werden. Der Ablauf einer Standard-PCR ist der Tabelle 1 zusammengefasst.

**Tabelle1: Standard Programm einer PCR**

Phase	Bezeichnung	Temperatur [°C]	Zeit [min]	
1	Initiale Denaturierung	95	5-10	
2	Denaturierung	95	0,5-1	} 30-35 Zyklen
3	Annealen der Primer	$T_m - 5$	0,5-1	
4	Elongation	72	0,5-1	
5	Abschließende Elogation	72	5-10	

$T_m$ : Schmelztemperatur der Primer

**Tabelle 2: Standard Zusammensetzung einer PCR**

Komponente	Endkonzentration
Polymerasepuffer (10x)	1x
MgSO <sub>4</sub> (25 mM)	0,5-5 mM
dNTPs (10 mM)	0,1-0,5 mM
Forward-Primer (50 pmol)	0,1 µM
Reverse-Primer (50pmol)	0,1 µM
Template-DNA	1 pg – 500 ng
DNA-Polymerase	0,25-0,5 U
ddH <sub>2</sub> O	Bis zu einem Volumen von 50 µl auffüllen

Die Amplifikation der DNA-Fragmente zur Herstellung der in dieser Arbeit hergestellten Konstrukte wurde mit Hilfe der KOD Polymerase nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Als Template für die TgOMP85-Konstrukte wurde das von der Firma Geneart generierte Plasmid verwendet, für die restlichen Konstrukte wurde genomische DNA aus *T. gondii* isoliert und für die Amplifikation eingesetzt.

### 2.6.1.2 Reverse-Transkription-PCR (RT-PCR)

Die Reverse-Transkription-PCR (RT-PCR) stellt eine Methode zur Umwandlung einer einzelsträngigen, spezifischen mRNA-Sequenz in die dazu komplementäre DNA (cDNA) dar. Für die reverse Transkription der RNA und die anschließende Amplifizierung bzw. PCR der cDNA wurde das SuperScript™III One-Step RT-PCR Kit der Firma Invitrogen verwendet. Durch den Einsatz isolierter RNA, genspezifischer Primer und eines Enzymgemisches, das gleichzeitig die SuperScript Reverse Transkriptase und eine Taq-Polymerase enthält, ist die initiale cDNA-Synthese und die darauffolgende PCR in einem Reaktionsgefäß möglich.

Die initiale reverse Transkription der RNA in cDNA erfolgt zunächst für 30 Minuten bei einer Temperatur von 45 - 60°C. Die daraus entstehende cDNA wird anschließend als Matrize für eine Amplifizierung durch die genannte Polymerase mit 3'-5'-Endonukleaseaktivität verwendet.

Für die Amplifikation von RNA-Fragmenten bzw. die Durchführung einer RT-PCR wurde RNA aus *T. gondii* isoliert. Die reversen Transkriptionen wurden mit Hilfe des SuperScript™III One-Step RT-PCR Kits nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

### 2.6.1.3 Gelelektrophorese von DNA

Bei der Agarosegelelektrophorese handelt es sich um eine Methode, mit der man DNA ihrer Größe nach voneinander separieren kann. Durch das Anlegen einer elektrischen Spannung erfolgt die Auftrennung der DNA-Moleküle über ihre negative Ladung und den Siebeffekt des Agarosegels. Um die aufgetrennten Moleküle mit Hilfe des UV-Lichts sichtbar zu machen, bedarf es der Zugabe von Ethidiumbromid, einem zwischen den Basen interkalierenden Agens, welches zuvor zur aufgekochten Agarose hinzugegeben wird. Die in dieser Arbeit verwendeten Agarosegele wiesen, wenn nicht anders aufgeführt, eine Konzentration von 1% Agarose auf, welche in TAE Puffer gelöst und mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versehen wurde. Die Spannung des elektrischen Feldes betrug 90 mA.

### 2.6.1.4 Aufreinigung von DNA

Die DNA-Moleküle, die man durch Amplifikation mittels einer PCR-Methode oder nach einem Verdau eines Plasmids erhielt, wurden je nach Reinheit entweder mit Hilfe des PCR-Aufreinigungs- oder Gelextraktionskits aufgereinigt. Beide Methoden beruhen auf der Bindung der zu eluierenden DNA an eine Matrix. Da beide Kits bzw. Systeme von der Firma SeqLab bezogen wurden, erfolgten die Aufreinigungen nach den Protokollen des Herstellers.

### 2.6.1.5 Fällung von DNA

Die Präzipitation von DNA aus salzhaltigen, wässrigen Lösungen erfolgte durch Zugabe von 2 Volumen 100%igem Ethanol und 0,1 Volumen 3M Natriumacetat erfolgen. Nach einer 60 minütigen Inkubation der DNA bei -20°C in den genannten Substanzen erfolgte ein Sedimentationsschritt für 20 Minuten bei einer Geschwindigkeit von 13000 rpm und einer Temperatur von 4°C. Um die Salze zu entfernen, wurde der Überstand verworfen und ein unter den gleichen Bedingungen stattfindender Waschschrift in 70% Ethanol durchgeführt. Anschließend wurde der hierbei gebildete Überstand verworfen, das DNA-Präzipitat getrocknet und abhängig von den darauffolgenden Experimenten entweder in H<sub>2</sub>O oder TE-Puffer (pH 8,0) resuspendiert.

### 2.6.1.6 Restriktion von DNA

Um ein DNA-Fragment in einen Vektor ligieren zu können, müssen beide zuvor mit den gleichen Enzymen behandelt werden. Zum Restriktionsverdau von DNA-Molekülen wurden sequenzspezifische Restriktionsendonukleasen verwendet. Die Nukleotidsequenzen haben meist eine Länge von vier bis acht Nukleotiden und stellen in den meisten Fällen Palindrome dar. Die Restriktionen wurden in der Regel mit ca. 0,2-0,3 µg DNA und bis zu 10 Einheiten (Units, U) der jeweiligen Enzyme im geeigneten Reaktionspuffer für 2-24 Stunden bei vom Enzymhersteller angegebener Temperatur durchgeführt.

Der Verdau der PCR-Produkte erfolgte an den in den Primern kodierten Restriktionsstellen. Um diese DNA-Moleküle verwenden zu können, mussten diese nach dem Verdau mit Hilfe des PCR-Aufreinigungskits bzw. Gelextraktionskits aufgereinigt werden.

### 2.6.1.7 Ligation

Um ein DNA-Molekül oder Insert in einen spezifischen Vektor ligieren zu können, müssen, wie oben angedeutet, beide Komponenten zuvor mit den gleichen Restriktionsenzymen behandelt werden, um ligationskompatible Enden zu generieren. Die Menge des Vektors, die für einen Ligationsansatz verwendet wurde, betrug in der Regel ca. 100 ng. Um die entsprechende Menge des Inserts mit Berücksichtigung seiner Größe und der Größe des Vektors berechnen zu können, wurde folgende Formel eingesetzt:

$$\frac{\text{Vektor [ng]} \times \text{Insert [kb]} \times 3}{\text{Vektor [kb]} \times 1} = \text{Insert [ng]}$$

Eine Ligation mit einem Gesamtvolumen von 20 µl wurde mit 1U der T4-DNA-Ligase und 0,1 Volumen des entsprechenden Reaktionspuffers über Nacht bei 16°C durchgeführt. Um den Ligationsansatz in *E. coli* transformieren zu können, wurde das Plasmid mit Ethanol (siehe Abschnitt 2.6.1.5) präzipitiert werden. Neben dem eigentlichen Ligationsansatz wurden zwei weitere Proben erstellt, die dazu dienten, das Vorhandensein von ungeschnittenem Vektor bzw. eine mögliche Religation des Vektors zu überprüfen. Diese beiden Kontrollen wiesen im Grunde genommen die gleichen Komponenten auf wie der eigentliche Ligationsansatz, jedoch enthielt die erste genannte Kontrolle keine Ligase, während die zweite ohne Insert angesetzt wurde. Wie der Ligationsansatz wurden beide Kontrollen ebenfalls über Nacht bei 16°C inkubiert, präzipitiert und anschließend in Bakterien transformiert.

### 2.6.1.8 Subklonierung in den TOPO-Vektor

Das Zero Blunt® PCR Cloning Kit ist ein Werkzeug, mit dem sich PCR-Produkte ohne jegliche Überhänge in den TOPO-Vektor klonieren lassen. Aufgrund der Tatsache, dass der pCR®Blunt Vektor das letale *ccdB*-Gen des Bakteriums *E. coli* gekoppelt an das C-terminale Ende des *lacZα*-Gens enthält, wird durch das Einbringen des gewünschten Inserts dieses letale Gen (*lacZα-ccdB*-Gen) zerstört. Das Screenen nach positiven Klonen wird dadurch vereinfacht, dass auf den Platten nur die Bakterien wachsen können, die einen pCR®Blunt Vektor mit aufgenommenen Insert aufweisen.

Mit Hilfe des Zero Blunt® PCR Cloning Kits von der Firma Invitrogen wurden einige Inserts mit nicht überhängenden Enden (blunt ends) zu Sequenzierungszwecken in den TOPO Vektor nach Herstellerprotokoll kloniert.

### 2.6.1.9 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR stellt im Wesentlichen eine herkömmliche Polymerase-Ketten-Reaktion dar und soll dazu dienen, die Ligation eines Inserts in den gewünschten Vektor zu überprüfen. Dabei wurden einzelne Kolonien zunächst auf eine Replikaplatte überimpft und in die bereits vorbereiteten PCR-Ansätze überführt. Um positive Klone ausfindig zu machen, wurde ein Insert- und ein Vektorspezifischer Primer verwendet. Positive Klone führten in der Kolonie-PCR zu einem PCR-Produkt mit der erwarteten Größe.



### 2.6.1.10 Aufreinigung von Plasmiden

Enthielten die bei der Ligation hergestellten Plasmide tatsächlich die gewünschten Inserts und ist deren Identität durch einen nachfolgenden Kontrollverdau mit spezifischen Restriktionsenzymen und eine Sequenzierung des Abschnitts kontrolliert und bestätigt worden, so war der nächste Schritt die Amplifizierung und Aufreinigung dieser Plasmide. Um eine höchstmögliche Ausbeute an Plasmid zu erhalten, wurde in der Regel eine Bakterienkultur von 400 ml verwendet. Die Aufreinigung an sich wurde nach den Anweisungen des Maxi-/ Miniprepkitherstellers durchgeführt und lediglich die Mengen der jeweiligen Puffer auf die Menge der Kultur angepasst.

### 2.6.1.11 Herstellung der TgOMP85-Konstrukte zu Transfektionszwecken in *Toxoplasma gondii*

Die Amplifikation und Klonierung des Gens TGME49\_072390 in den TUB8mycGFPMyoATy-HX\_117 wurde von der Firma GeneArt durchgeführt. Dabei wurde das Gen ohne Stoppcodon zwischen die beiden Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *NsiI* eingebracht. Daran angefügt ist ein Gen, welches für den Ty-Tag kodiert. Letzteres befindet sich somit zwischen der genannten *NsiI*-Schnittstelle und einer *PacI*-Schnittstelle.

Alle weiteren, verkürzten Versionen des TGME49\_072390 Gens wurden über die genannten Schnittstellen des Vektors in unserer Arbeitsgruppe generiert.

Neben dem TUB8mycGFPMyoATy-HX\_117-Vektor kam auch der T7Sag4HXGPRT (V112) für weitere Klonierungen des TGME49\_072390 Gens zum Einsatz, wobei die Schnittstellen beibehalten wurden.

## 2.7 Arbeiten mit *Escherichia coli*

### 2.7.1 Aufbereitung elektrokompetenter *E. coli*

Damit Bakterien in der Lage sind, Plasmide aufzunehmen, müssen diese zunächst kompetent gemacht werden. Die in dieser Arbeit zu Plasmidaufreinigungszwecken verwendeten Bakterien gehören dem TOP10 *E. coli* Stamm an und wurden für weitere Arbeitsschritte elektrokompetent und so fähig zur Aufnahme von Plasmiden durch Elektroporation, gemacht.

Um elektrokompetente TOP10 Zellen zu erhalten, wurden ca. 10 ml Superbroth Medium ohne Zusatz von Antibiotikum mit eingefrorenen TOP10 *E. coli* inokuliert und agitierend bei 37°C, 250 rpm, über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden 6 ml dieser Übernachtskultur

zum Animpfen einer insgesamt 600 ml umfassenden Kultur verwendet. Auch diese Kultur wurde wiederum agitierend bei 37°C, 250 rpm und in Superbroth, ohne Zusatz von Antibiotika inkubiert. Nach ca. vier Stunden folgte eine 10 minütige Inkubation der Kultur auf Eis. Danach wurden die Bakterien für weitere 10 Minuten bei 4°C und 6000 rpm sedimentiert, der Überstand verworfen und das verbleibende Pellet zwei Mal mit eiskühlem, autoklaviertem  $\text{ddH}_2\text{O}$  und ein Mal mit einer ebenfalls gekühlten und autoklavierten 10 prozentigen Glycerinlösung gewaschen. Die einzelnen Waschschriffe erfolgten wie der erste Sedimentationsschritt jeweils für 10 Minuten, bei 4°C und 6000 rpm. Nach dem letzten Waschschriff wurde der Überstand verworfen und das Bakterienpellet in 1,2 ml 10 prozentiger Glycerinlösung resuspendiert und in 100  $\mu\text{l}$  Aliquots aufgeteilt. Während der Aufteilung des Pellets in die Reaktionsgefäße wurden die Bakterien gleichzeitig schockgefrostet und anschließend bei -80°C gelagert. Ein wichtiger Punkt bei der Herstellung kompetenter *E. coli* ist, dass alle Arbeitsschritte bei 4°C erfolgen.

Um die Kompetenz und damit verbundene Transformationseffizienz der auf diesem Wege hergestellten TOP10 Zellen zu überprüfen, wurden diese mit 1 pg/ $\mu\text{l}$  pUC18-Vektor transformiert, ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Anzahl der Kolonien zur Berechnung der Transformationseffizienz ermittelt.

### 2.7.2 Transformation von Plasmiden in elektrokompetente *E. coli*

Für die Transformation von DNA in *E. coli* wurde folgendes verwendet:

- 50  $\mu\text{l}$  elektrokompetente TOP10 *E. coli*, die vor der Elektroporation auf Eis aufgetaut wurden,
- 1 ml vorgewärmtes SOC-Medium,
- eine Küvette (Spaltbreite: 2mm)
- und 5-10  $\mu\text{l}$  Ligationsansatz.

Die entsprechenden Parameter für die anstehende Elektroporation wurden mit 2 kV, 200  $\Omega$  und 25  $\mu\text{F}$  am Gerät (Gene Pulser II, Biorad) eingestellt.

Der Ligationsansatz wurde dann mit den *E. coli* gemischt, in die Küvette überführt und die Plasmide durch die Elektroporation in die Bakterien eingebracht. Anschließend wurden die transformierten Bakterien mit 1 ml SOC-Medium vermischt, in ein anderes Reaktionsgefäß überführt und für eine Stunde agitierend bei 37°C inkubiert. Zuletzt erfolgte das Ausplattieren dieser Bakterien auf Antibiotikum enthaltenden Agar-Platten, mit anschließender Inkubation über Nacht bei 37°C.

### 2.7.3 Überprüfung positiver Kolonien

Die Identifikation positiver Klone mit korrektem Plasmid erfolgte mit Hilfe der in 2.6.1.9 genannten Kolonie-PCR und eines Kontrollverdaus nach Aufreinigung der amplifizierten Plasmide durch ein Miniprekit.. Die Überprüfung auf mögliche Mutationen hin erfolgte durch Sequenzanalysen. Lagen keine Mutationen vor, wurde eine unter 2.6.1.10 geschilderte Aufreinigung durchgeführt.

## 2.8 Arbeiten mit *Toxoplasma gondii*

### 2.8.1 Zellkultur

#### 2.8.1.1 Kultivierung der Wirtszellen

##### 2.8.1.1.1 Kultivierung von humanen Vorhautfibroblasten (Human foreskin fibroblast, HFF)

Eine humane Wirtszelllinie, die der Kultivierung des Parasiten *Toxoplasma gondii* diene, war die der HFF. Diese wurden in speziellen Zellkulturflaschen für adhärente Zellen kultiviert, die für eine optimale CO<sub>2</sub>-Versorgung einen sogenannten Filtercapverschluss aufwiesen. Je nach Bedarf wurden die HFF in Zellkulturflaschen mit verschiedenen großen Flächen (25 cm<sup>2</sup>, 75 cm<sup>2</sup> oder 175 cm<sup>2</sup>) kultiviert. Diese HFF sind Zellen, die im Vergleich zu anderen humanen Zelllinien einen sogenannten Monolayer bilden und somit nur in einer ebenmäßigen Fläche und nicht übereinander wachsen. Sobald diese Art von Zellen zu ca. 80-90% konfluent angewachsen waren, wurden diese vom Boden der Zellkulturflasche gelöst und zur Weiterkultivierung aufgeteilt. Dafür wurde die dicht gewachsene Kultur zunächst mit Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) gewaschen und dieses anschließend wieder entfernt. Danach wurde je nach Größe der Kultur zwischen drei bis zehn ml 1xTrypsinlösung mit EDTA hinzugefügt und kurz auf den Zellen belassen. Nach dem Verschließen der Flasche erfolgte ein 10-15 minütiger Inkubationsschritt bei 37°C, währenddessen sich die HFF vom Boden der Zellkulturflasche lösen konnten. Anschließend wurde das Ablösen der Zellen mikroskopisch überprüft und die Zellen danach in gewünschter Menge DMEM, welches L-Glutamin, Penicillin, Streptomycin (Pen-Strep) und 10 % FCS enthielt, aufgenommen. Je nach Anforderung wurden die HFF dann auf die verschiedenen großen Zellkulturflaschen verteilt und unter Zufuhr von 5 % CO<sub>2</sub> bei 37°C bis zu der oben genannten Konfluenz inkubiert.

### **2.8.1.1.2 Kultivierung von Vero-Zellen (Nierenzellen von grünen Meerkatzen)**

Neben der humanen Wirtszelllinie HFF wurde zur Kultivierung von *T. gondii* auch eine tierische Zelllinie verwendet. Dabei handelte es sich um die Nierenzellen der grünen Meerkatze, die auch unter der Bezeichnung Vero-Zellen bekannt sind. Im Vergleich zu den HFF, die man aufgrund ihres Monolayerwachstums bevorzugt für mikroskopische Analysen verwendet, erfolgte die Kultivierung von *T. gondii* in Vero-Zellen, wenn eine sehr hohe Parasitenanzahl angestrebt wurde. Dies war zum Beispiel bei proteinbiochemischen Experimenten der Fall. Die Kultivierung der Vero-Zellen erfolgte im Wesentlichen wie die der HFF, jedoch war hierbei aufgrund des schnellen und mehrschichtigen Wachstums eine häufigere Passagierung notwendig. Das Ablösen, die Aufteilung und die Kultivierung der Vero-Zellen wurde unter den gleichen Bedingungen wie für die humanen HFF durchgeführt (siehe Abschnitt 2.8.1.1.1).

### **2.8.1.2 Kultivierung von *Toxoplasma gondii* Tachyzoiten**

Die Kultivierung der *T. gondii* Tachyzoiten erfolgte in Abhängigkeit des durchzuführenden Experimentes entweder in den genannten HFF oder in Vero-Zellen. Um die Parasiten kultivieren zu können, wurden diese auf einen konfluenten, Wirtszellmonolayer überführt und in DMEM mit L-Glutamin, Pen-Strep und 10% FCS, unter 5 % CO<sub>2</sub>-Zufuhr, bei 37°C inkubiert. Nach einigen Tagen lagen die Tachyzoiten aufgrund der Lyse ihrer Wirtszellen extrazellulär vor und standen somit für eine weitere Passage zur Verfügung.

### **2.8.1.3 Transfektionen von *Toxoplasma gondii***

#### **2.8.1.3.1 Transiente Transfektion von *Toxoplasma gondii* (Kim et al., 1993)**

Die transiente Transfektion stellt eine Methode zur Analyse der Expression von Genen bzw. der Funktion der von ihnen kodierten Proteine dar. Dafür ist es notwendig, Plasmid-DNA in das Tachyzoitenstadium von *T. gondii* einzubringen. Dies erreicht man u.a. durch eine Elektroporation der Parasiten (Kim et al., 1993), die beispielsweise mit Hilfe des BTX square wave Elektroporators durchgeführt werden kann.

Für die in dieser Arbeit durchgeführten transienten Transfektionen wurden in der Regel 50-100 µg aufgereinigte Plasmid-DNA verwendet, die in 800 µl Cytomix gelöst wurde. Die extrazellulär vorliegenden Tachyzoiten einer 25 cm<sup>2</sup> großen Zellkulturflasche (~3x10<sup>7</sup>) wurden in ein Reaktionsgefäß überführt, bei 2000 rpm 5-10 Minuten sedimentiert und der

Überstand verworfen. Je nach Wunsch konnte das Parasitenpellet nach diesem Sedimentationsschritt mehrmals mit Cytomix gewaschen werden. Anschließend wurden die sedimentierten Tachyzoiten in 300 µl Cytomix aufgenommen und darin resuspendiert. 100 µl ( $\sim 1 \times 10^7$ ) der Tachyzoiten wurden mit der bereits in Cytomix gelösten Plasmid-DNA vermischt und in eine Küvette überführt. In einem darauf folgenden Schritt erfolgte dann die Elektroporation der Tachyzoiten mit Hilfe des genannten BTX-Elektroporators, wobei dies bei einer Spannung von 2 kV (High Voltage), einem Widerstandswert von  $25 \Omega$  und einer Kapazität von 50 µF durchgeführt wurde. Zuletzt wurde der gesamte Transfektionsansatz auf HFF gegeben und in DMEM, versetzt mit L-Glutamin, Pen-Strep und 10% FCS, bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Zufuhr inkubiert.

Für eine Lokalisationsanalyse eines bestimmten Proteins mit Hilfe eines Immunfluoreszenzmikroskops wurden die Tachyzoiten nach der Elektroporation in HFF kultiviert, die auf runden Deckgläschen in einer 24-Well Platte angewachsen waren.

### **2.8.1.3.2 Stabile Transfektion von *Toxoplasma gondii***

Im Vergleich zur transienten Transfektion, bei der das eingebrachte Plasmid episomal im Parasiten vorliegt und nach einer gewissen Zeit wieder abgebaut werden kann, soll bei einer stabilen Transfektion das jeweilige Plasmid fest in das Parasitengenom integriert werden. Eine Integration in das Genom kann u.a. die Expression des eingeführten Gens erhöhen oder durch homologe Rekombination das endogene Gen ersetzen. Durch letzteres und durch Einbringen eines Kontrollsystems kann man die Expression eines Gens regulieren. Auch wenn die Integration eines Gens und das Ersetzen des jeweiligen endogenen Gens durch homologe Rekombination in *T. gondii* im Vergleich zu anderen Protozoen eine eher weniger erfolgreiche Methode darstellt (Striepen und Soldati, 2007), ist dies trotz allem möglich. Ausschlaggebend dabei ist die Größe des einzubringenden Gens. Dieses sollte, um ein Ersetzen des gewünschten, endogenen Gens durch homologe Rekombination zu erzielen, nach Möglichkeit mehrere Kilobasen umfassen (Donald und Roos, 1994; Roos *et al.*, 1994). Nichtsdestotrotz findet in den meisten Fällen die Integration des eingeführten Gens zufällig und ungerichtet statt.

Alle Versuche der stabilen Transfektion, die in dieser Arbeit durchgeführt wurden, dienten dem proteinbiochemischen Nachweis der von den eingebrachten Plasmiden kodierten Proteine. Da eine Detektion dieser Proteine nach einer transienten Transfektion nicht möglich war, wurde versucht, stabil transfizierte Parasitenlinien zu generieren. Dazu wurden im Wesentlichen die gleichen Arbeitsschritte wie im vorherigen Abschnitt durchgeführt, nur mit dem Unterschied, dass das einzubringende Plasmid vor der Elektroporation mit Hilfe des

Enzyms *NotI* linearisiert und der verwendete Cytomix mit 2 mM ATP und 2 mM GSH versetzt wurde. Zum Transfektionsansatz wurden einige Einheiten des Enzyms *NotI* hinzugegeben, eine Methode, die auch als Restriction enzyme mediated integration (REMI) bekannt ist und dazu dienen soll die Transformations- / Transfektionseffizienz um ein vielfaches zu erhöhen (Black *et al.*, 1995). Nach der Elektroporation wurden die Tachyzoiten (Stamm RHxgprt-) entweder auf HFF in einer 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche oder in 6-Well Platten gegeben und in DMEM mit L-Glutamin, Pen-Strep und FCS über Nacht bei 37°C und CO<sub>2</sub>-Zufuhr inkubiert. 24 Stunden nach der Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel und die erste Zugabe der beiden Selektionsdrogen Mykophenolsäure (25 µg/ml) und Xanthin (50µg/ml). Die Selektion mit beiden genannten Drogen erfolgte ca. sieben Tage lang, wobei die Parasiten, sobald sie extrazellulär vorlagen, immer wieder auf neue, konfluent gewachsene HFF gegeben wurden. Nach ca. einer Woche wurden mit extrazellulär vorliegenden Tachyzoiten eine Immunfluoreszenz zur Expressionskontrolle und eine Klonierung durchgeführt. Lagen die Parasiten nach der angegebenen Zeit jedoch noch nicht alle extrazellulär im Medium vor, so wurden die Tachyzoiten enthaltenden HFF mit einem Zellschaber vom Boden der Kulturflasche gelöst und mehrmals durch eine Spritze mit einer Kanüle (27G) gepresst. Durch dieses Verfahren wurden die Wirtszellen lysiert und die in ihnen wachsenden Parasiten erhalten.

Um positive Klone mit dem gewünschten, integrierten Gen aus dem Gesamtpool der transfizierten Parasiten zu erhalten, wurde die Klonierung durchgeführt, bei der es sich um eine Vereinzelung der Tachyzoiten handelt. Dazu wurde vor der Klonierung eine 96-Well Platte mit HFF vorbereitet, die für diesen Zweck 90-100% konfluent bewachsen sein sollte. Vor dem eigentlichen Klonierungsschritt wurde das Medium in der Mikrotiterplatte durch die Zugabe von 100 µl DMEM, versetzt mit L-Glutamin, Pen-Strep, FCS und den bei den Selektionsdrogen Mykophenolsäure und Xanthin ersetzt. Die Vereinzelung der Tachyzoiten erfolgte über eine Verdünnungsreihe, wodurch jedem einzelnen Well der Mikrotiterplatte 0,5-1 Parasit zugegeben wurde. Anschließend wurde die inokulierte Mikrotiterplatte für 10 Tage bei 37°C, unter CO<sub>2</sub>-Zufuhr inkubiert. Während dieser Zeit durfte die 96-Well Platte nicht bewegt werden. Um die positiven Klone identifizieren zu können, wurden die einzelnen Wells der Mikrotiterplatte nach der angegebenen Zeit unter dem Mikroskop nach Plaques untersucht. Lag in einem Well nur ein Plaque und damit nur ein Klon vor, so wurden alle darin enthaltenen Zellen ausgeschabt und auf neue HFF in ein Well einer 48er Platte so lange kultiviert bis genügend Parasiten für eine Analyse mit dem Immunfluoreszenzmikroskop vorlagen. Mit diesem mikroskopischen Versuchsansatz wurde schließlich überprüft, ob der gewählte Klon das gewünschte Protein, welches durch einen Tag markiert war, synthetisiert.

Eine solche stabile Transfektion wurde für alle im Ergebnisteil aufgeführten Konstrukte des TgOMP85 Proteins versucht.

### **2.8.1.3.3 Herstellen von konditionalen Mutanten**

Um die Funktion des TGME49\_072390 Gens bzw. des hypothetischen Proteins, welches durch dieses kodiert wird, *in vivo* analysieren zu können, sollte das endogene Gen ausgeknockt und durch die Anwesenheit einer regulierbaren zweiten Kopie desselben Gens komplementiert werden. Mit Hilfe einer sogenannten TATi-Parasitenlinie und eines auf Tetrazyklin basierenden Systems (Meissner *et al.*, 2002; van Dooren *et al.*, 2008) sollte die Expression des TGME49\_072390 Gens schließlich reguliert und die Auswirkungen einer Expressionsinhibition auf den Proteintransport in den Apikoplasten bzw. die Viabilität von *T. gondii* näher analysiert werden.

### **2.8.1.4 Einfrieren der Parasiten und deren Wirtszellen**

Um *T. gondii* Tachyzoiten längerfristig aufzubewahren, müssen diese in einer DMSO-Lösung konserviert und in flüssigem Stickstoff gelagert werden. Dazu wurden die Parasiten in HFF so lange kultiviert, bis sie extrazellulär vorlagen. An diesem Punkt wurden die Tachyzoiten umgehend in ein Reaktionsgefäß überführt und bei 2000 rpm für fünf Minuten sedimentiert. Anschließend wurde der Überstand entfernt und das Pellet in 500 µl einer Lösung aufgenommen, die aus 50% FCS und 50% DMEM mit Penicillin und Streptomycin bestand. Zusätzlich wurden weitere 500 µl einer weiteren Lösung aus 20% DMSO und 80% DMEM mit Penicillin und Streptomycin hinzugegeben. Mit Hilfe einer Pipette wurde die Zellsuspension vorsichtig resuspendiert und danach in ein Kryogefäß überführt. Dieses wurde dann für einige Tage bei –80°C gekühlt und schließlich für die längerfristige Aufbewahrung in flüssigem Stickstoff gelagert. Alternativ zu extrazellulären Tachyzoiten können auch intrazelluläre Parasiten auf diesem Weg für eine Lagerung im flüssigen Stickstoff aufbereitet werden.

Die hier verwendeten Wirtszellen (HFF und Vero-Zellen) wurden ebenfalls nach dem beschriebenen Protokoll für eine längerfristige Lagerung präpariert.

### 2.8.1.5 Auftauen der Parasiten und deren Wirtszellen

Für das Auftauen der in DMSO konservierten Parasiten und deren Wirtszellen wurden diese in einem Wasserbad bei einer Temperatur von ca. 37°C oder unter der Sterilbank bei Raumtemperatur (RT) aufgetaut. Anschließend überführte man die Zellen in eine, zuvor mit DMEM, L-Glutamin, Pen-Strep und 10% FCS befüllt wordene, Zellkulturfläche. Zur Entfernung der für die Lagerung verwendeten DMSO-Lösung wurde am darauffolgenden Tag das Medium gewechselt.

### 2.8.2 Isolierung von Nukleinsäuren

#### 2.8.2.1 Isolierung von RNA aus *T. gondii*

Um eine RT-PCR und eine anschließende cDNA- Amplifikation durchführen zu können, musste zunächst die Parasiten-RNA isoliert werden. Dafür wurden die HFF mit den intrazellulären Tachyzoiten abgeschabt und aus der Zellkulturflasche in eine Spritze mit einer Kanüle (27 G) überführt. Durch das mehrmalige Aufziehen der Spritze sollte es zur Ruption der Wirtszellen und Freisetzung der intrazellulären Tachyzoiten kommen. Bei einer Geschwindigkeit von 1200 rpm und einer Temperatur von 4°C wurde ein erster Sedimentationsschritt der Tachyzoiten durchgeführt. Ein weiterer erfolgte darauf bei 5000 rpm und der resultierende Überstand wurde bis auf ca. 50 µl abgenommen, das Pellet hingegen gevortext und in 1,5 ml TRIzol resuspendiert. Es folgte eine Inkubation bei -80°C für 15 Minuten und anschließend eine weitere bei 42°C für 10 Minuten. Nach der Zugabe von 300 µl Chloroform wurde die Zellsuspension für 15 Sekunden invertiert und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin folgte ein weiterer, 10 minütiger Sedimentationsschritt bei 13000 rpm und 4°C, wodurch es zur Bildung von zwei unterschiedlichen Phasen kommen sollte. Die obere Phase mit der darin enthaltenen RNA wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 300 µl Isopropanol versetzt und für ca. eine Stunde bei -80°C inkubiert. Nach diesem Schritt folgten eine Inkubation bei Raumtemperatur für zehn Minuten und eine Sedimentation für 10 Minuten, bei 4°C und 13000 rpm. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen. Anschließend wurde der resultierende Überstand erneut verworfen und das Pellet in 50 µl DEPC-Wasser und 1 µl RNase-Out aufgenommen. Letzteres wurde zum Entfernen bzw. Deaktivierung möglicher RNasen durchgeführt.

Die auf diesem Wege isolierte RNA wurde danach entweder direkt zur Durchführung einer RT-PCR verwendet oder bei -80°C bis zum Gebrauch gelagert.



### 2.8.2.2 Isolierung von DNA aus *T. gondii*

Für die Isolierung von DNA aus *T. gondii* wurden  $10^8$  extrazelluläre Tachyzoiten verwendet. Diese wurden zunächst für 5 Minuten bei 2200 rpm sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen, während das Pellet in 250 µl PBS und 250 µl WEHI-Puffer aufgenommen und für 2 Minuten bei RT inkubiert wurde. Anschließend folgte eine Phenol-Chloroform-Extraktion, die in der Zugabe von 500 µl Phenol-Chloroform zu dem Pellet und einem Sedimentationsschritt (140000 rpm, 4 Minuten) bestand. Der hierbei entstandene Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und gegebenenfalls bis auf ein Volumen von 500 µl mit TE-Puffer aufgefüllt. Danach folgte eine weitere Phenol-Chloroform-Extraktion. Diese wurde so lange wiederholt, bis die dabei entstandene obere Phase klar wurde. Lag diese Phase klar vor, so wurde eine Präzipitation durchgeführt (siehe 2.6.1.5). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 400 µl TE-Puffer aufgenommen und erneut mit Phenol-Chloroform extrahiert. Mit dem dabei entstandenen Überstand wurde anschließend eine Chloroform-Extraktion und Ethanolfällung durchgeführt. Zuletzt wurde der Überstand verworfen und das verbleibende Pellet in 50 µl TE-Puffer aufgenommen.

## 2.9. Fluoreszenzmikroskopie

### 2.9.1. Immunfluoreszenz Assay (IFA)

Für die Durchführung eines IFA wurden  $\sim 10^7$  extrazelluläre, transfizierte Tachyzoiten auf HFF gegeben, die einige Tage zuvor in eine 24-Well-Platte mit runden Deckgläschen eingesät wurden. Dabei erhielt jedes Well mit HFF ca.  $5 \times 10^5$  Parasiten. Die Immunfluoreszenzanalyse wurde 48 Stunden nach der Transfektion der Tachyzoiten durchgeführt, wobei zunächst zwei Waschschriffe mit PBS, pH 7,4 erfolgten. Daraufhin erfolgte die Fixierung der Zellen mit 4% Paraformaldehyd in PBS, pH 7,4 und deren Permeabilisierung mit Hilfe einer 0,5 prozentigen Triton X-100-Lösung, die ebenfalls mit PBS, pH 7,4 angesetzt wurde. Nach zwei weiteren Waschschriffen mit PBS wurden die Zellen mit 5% BSA in PBS für eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt und anschließend mit dem gewünschten Primärantikörper in der jeweiligen Verdünnung für eine weitere Stunde, ebenfalls bei Raumtemperatur, inkubiert. Um eine möglichst geringe Menge des Antikörpers einzusetzen, wurden die Deckgläschen dabei invertiert, damit die Seite, auf der sich die Zellen befanden, in Kontakt mit dem verdünnten Primärantikörper kommen konnte. Dieser wurde zuvor auf Parafilm gegeben. Anschließend wurden die Deckgläschen zurück in die 24-Well Platte überführt, drei Mal für 5 Minuten mit PBS gewaschen und für eine Stunde mit dem jeweiligen Zweitantikörper bei RT inkubiert. Dieser Inkubationsschritt fand im

Dunklen statt, um eine Reduktion des Signals des an den Zweitantikörper gekoppelten Farbstoffs zu verhindern. Danach wurde die Antikörperlösung entfernt und drei Waschschritte mit PBS, ebenfalls im Dunklen, durchgeführt. Für das Sichtbarmachen der Nuklei folgte ein weiterer Inkubationsschritt mit Hoechst (5 µg/ml) für 10 Minuten bei RT. Nach dem Anfärben der Zellkerne wurden die Zellen zwei Mal mit PBS und ein Mal mit  $\text{ddH}_2\text{O}$  für je 5 Minuten in der 24 Well-Platte bei RT gewaschen. Schließlich wurden die Deckgläschen aus den Wells herausgenommen und mit der Seite, auf der sich die zu untersuchenden Zellen befanden, auf einen Tropfen Fluorprep für die folgende Analyse mit dem Fluoreszenzmikroskop überführt.

Die Primärantikörper, die in dieser Arbeit für IFA verwendet wurden, waren der Maus-Anti-Ty Antikörper (1:20), Kaninchen-Anti-HA Antikörper (1:50), Kaninchen-Anti V5 Antikörper (5 µg/ml) und die Seren gegen das hypothetische Protein TgOMP85 (TGME49\_072390) (1:50). Die verwendeten Zweitantikörper waren, die Cy2 Ziege-Anti-Maus, Cy3 Ziege-Anti-Maus, Cy2 Ziege-Anti-Kaninchen und Cy3 Ziege-Anti-Kaninchen Antikörper. Alle genannten Sekundärantikörper wurden in einer 1:2000 Verdünnung eingesetzt. Sowohl die Primär- als auch die Sekundärantikörper wurden dabei in einer 5 prozentigen BSA-Lösung verdünnt.

### **2.9.1.2 Bearbeitung der IFA-Daten mit Hilfe des ImageJ-Programmes**

Die Bearbeitung und Präsentation der Daten aus den einzelnen IFA fand mit Hilfe des Image J Programmes und Power Point (von Microsoft) statt. Dafür wurden die einzelnen Bilder zunächst in 8-bit greyscale Abbildungen konvertiert und der Hintergrund reduziert. Nach Zuordnung der Signale zu den einzelnen Farbkanälen und dem Herstellen eines Overlays wurden die Daten mit Hilfe von Power Point zu Präsentationszwecken bearbeitet.

## **2.10 Analysen rekombinanter Fusionsproteine**

Die Herstellung und anschließende Aufreinigung rekombinanter Fusionsproteine stellt eine Methode dar, Proteine zu gewinnen um diese im Anschluss auf verschiedene Weisen analysieren zu können. Mit Hilfe verschiedener Tags, welche als Teil der Fusionsproteine exprimiert werden, können Proteine aufgereinigt und detektiert werden.

In dieser Arbeit wurde versucht, rekombinante, Histidin (His)- getaggte Fusionsproteine mit Hilfe des QIAexpress Systems der Firma Qiagen zu generieren und aufzureinigen. Dabei basiert dieses System darauf, dass die His-getaggtten Proteine spezifisch und mit hoher Affinität an Nickel-Nitriloessigsäure (NTA), welche an Sepharose gekoppelt ist, binden. Diese

starke Interaktion kann daher nach erfolgter Expression für eine Aufreinigung genutzt werden.

### 2.10.1 Herstellung und Expression His-getaggtter Fusionsproteine

Wie bereits erwähnt, sollen in dieser Arbeit zwei rekombinante His-getaggte Fusionsproteine mit Hilfe des QIAexpress Systems der Firma Qiagen generiert und aufgereinigt werden, um anschließend Antikörper gegen jene synthetisieren zu können, und gegebenenfalls elektrophysiologische Eigenschaften nach Rekonstitution der Proteine in Membranen bestimmen zu können. Bei dem ersten Protein handelte es sich um ein Fragment von TgOMP85, welches die Aminosäuren 91-259 enthält (TgOMP85<sup>91-259</sup>), während das zweite Protein TgOMP85 voller Länge darstellt. Für die Herstellung der rekombinanten Proteine wurden die jeweiligen kodierenden Sequenzen amplifiziert und in den Expressionsvektor pQE30-UA ligiert. Jedoch verlief nur die Klonierung von TgOMP85<sup>91-259</sup> erfolgreich, so dass in den weiteren Versuchen nur mit diesem His-getaggtten Protein weiter gearbeitet wurde. Um eine durch IPTG induzierbare Testexpression durchführen zu können, wurde das pQE30-UA Plasmid mit der kodierenden Sequenz für TgOMP85<sup>91-259</sup> zunächst in verschiedene *E. coli* Stämme (BL21-DE / RIL, DH5 $\alpha$ , Rosetta und XL-Blue / Gold) transformiert. Da sich keinerlei Kolonien nach den Transformationen in den Bakterienstämmen BL21-RIL, DH5 $\alpha$ , XL-Blue und Gold bildeten, wurden zu Expressionszwecken nur die Kolonien der *E. coli* Stämme BL21-DE und Rosetta verwendet. Für die Durchführung der Testexpression wurden jeweils eine BL21-DE und eine Rosetta-Kolonie für das Inokulieren einer 5 ml Übernachtskultur ausgewählt. Beide Kulturen wurden agitierend bei 37°C, in flüssigem LB-Medium, welches im Falle der BL21-DE Kultur mit 50  $\mu$ g/ml Ampicillin und im Falle der Rosetta Kultur zusätzlich mit 100  $\mu$ g/ml Chloramphenicol versetzt wurde, kultiviert. Die Zugabe von Chloramphenicol bewirkt die Beibehaltung des zusätzlichen Plasmids des Rosetta Stamms, das für drei weitere tRNAs kodiert, die zu einer stärkeren Expression beitragen. Am darauf folgenden Tag wurden die 5 ml der Übernachtskulturen zum Animpfen einer 50 ml Kultur verwendet. Stündlich wurde 1 ml beider Kulturen entnommen und deren optische Dichte (OD<sub>600</sub>) photometrisch ermittelt. Bei einem OD-Wert von 0,4 - 0,6 erfolgte die Induktion mit IPTG, wobei die eingesetzte Endkonzentration 1 mM betrug. Danach wurde über einen Zeitraum von bis zu 4 Stunden nach der Induktion stündlich 1 ml Kultur entnommen, diese sedimentiert, das Pellet in 50  $\mu$ l PBS, pH 7,4 mit Proteaseinhibitor ([PMSF] = 1 mM) und 50  $\mu$ l Probenpuffer (2x) aufgenommen und aufgekocht. Mit anschließenden proteinbiochemischen Verfahren (SDS-PAGE und Western-Blot) wurde schließlich die Expression überprüft. Ebenso wurde eine vor der Induktion als Kontrolle entnommene Probe

analysiert. Von diesen Proben wurde jeweils ein Äquivalent von 200 µl der Bakterienkultur geladen.

Um die Löslichkeit des exprimierten Proteins zu bestimmen, wurden die Testexpressionen unter gleichen Bedingungen erneut durchgeführt. Jedoch wurden hierbei nicht stündlich Proben entnommen, sondern nur nach einer festen Expressionszeit von 4 Stunden. Diese Proben wurden ebenfalls sedimentiert, die Pellets in PBS, pH 7,4, und PMSF aufgenommen und die *E. coli* durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen (drei Zyklen) lysiert. Durch einen Sedimentationsschritt bei 4°C und 13000 rpm erfolgte eine Auftrennung der löslichen von membrangebundenen Proteinen. Die Löslichkeit des His-getaggten TgOMP85<sup>91-256</sup> wurde mit Hilfe von Western Blots näher analysiert.

### **2.10.2      Aufreinigung des His-getaggten TgOMP85<sup>91-256</sup> mit Hilfe des Ni-NTA-Resins (unter nativen Bedingungen)**

Wie bei der Testexpression wurden für die Aufreinigung von TgOMP85<sup>91-256His</sup> zunächst Übernachtskulturen mit transformierten Klonen der beiden *E. coli* Stämme BL21-DE und Rosetta angeimpft. Am darauf folgenden Tag wurden Hauptkulturen von je 200 ml mit den Übernachtskulturen inokuliert. Sowohl die Antibiotika als auch deren Konzentrationen waren die gleichen wie im vorherigen Abschnitt beschrieben. Bei einem OD-Wert von 0,4-0,6 erfolgte die Induktion mit IPTG, zur Endkonzentration von 1 mM.

Nach einer Expressionszeit von 2-4 Stunden wurden die Hauptkulturen für 20 Minuten bei 4°C und 5000 rpm sedimentiert. Die Überstände wurden danach verworfen und die Pellets jeweils in 4 ml Lysepuffer, der mit einer Endkonzentration von 1mM PMSF versetzt wurde, aufgenommen und in andere Reaktionsgefäße überführt. Nach einer Inkubationszeit von 10-20 Minuten bei 4°C wurden die Bakterien zur effizienteren Lyse in die French Press überführt. Durch den in der French Press aufgebauten Druck (1000 PSIG) und die durch die Auf- und Abbewegungen des Kolbens induzierten Scherkräfte wurden die bakteriellen Zellwände aufgebrochen. Anschließend wurden die Bakteriensuspensionen in der Ultrazentrifuge bei 4°C, 30000 rpm, für 1h sedimentiert. Dieser Schritt diente der Trennung der löslichen von membrangebundenen Proteinen. Die lösliche Fraktion wurde anschließend in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit einer Spritze durch einen Filter mit einer Porengröße von 0,2 µm gepresst, um mögliche Rückstände des Pellets zu beseitigen. 4 ml der gewonnenen löslichen Proteinfraction wurden mit 1 ml 50% Ni-NTA Lösung versetzt und für eine Stunde bei 4°C auf einem Taumelmischroller inkubiert. In dieser Zeit konnte TgOMP85<sup>91-256His</sup> an die Ni-NTA Agarose binden. Danach wurde diese Lösung nach und nach in eine mit Filter (Porengröße 35 µm) versehene Säule (Tubing-to-Luer-Lock Säule von

der Firma Mobicol) überführt und durch hintereinander folgende Zentrifugationsschritte durch diese geleitet. Aufgrund der Größe der aufzureinigenden Proteine und der Interaktion zwischen den His-getaggtten Proteinen und der Ni-NTA Agarose sollten die Fusionsproteine im oberen Teil der Säule verbleiben und daher nicht im Durchfluss zu finden sein. Letzterer wurde zu Kontrollzwecken für proteinbiochemische Analysen aufbewahrt. Nach dem Durchfließen ungebundener Proteine durch die Säule folgten zwei Waschschrte mit je 4 ml Waschpuffer. Auch diese Durchflüsse wurden als Waschrte 1 und 2 (W1, W2) aufgehoben. Die Elution des gebundenen TgOMP85<sup>91-256His</sup> wurde mit vier Elutionsschritten durchgeführt, wobei jeweils 500 µl Elutionspuffer verwendet wurden. Um die Effizienz der Elutionen überprüfen zu können, wurde die in der Säule verbliebene Ni-NTA-Agarose bis zu einem Volumen von 500 µl mit Elutionspuffer versetzt und wie die anderen Proben in Probenpuffer aufgekocht. Alle Zentrifugationsschritte, die mit der Säule durchgeführt wurden, fanden jeweils für eine Minute bei 4°C und 10000 rpm statt.

### **2.10.3      Aufreinigung von TgOMP85<sup>91-256His</sup> mit Hilfe von Talon-Resin**

Als Alternative zur Ni-NTA Agarose und zum Vergleich der Aufreinigungseffizienz wurde für die Aufreinigung des Proteins zusätzlich das Kobalt Talon Resin (bezogen von der Firma Clontech) verwendet. Dabei wurden die gleichen transformierten Klone der beiden *E. coli* Stämme BL21-DE und R osetta für die Kulturen eingesetzt. Die Aufreinigung wurde im Wesentlichen wie jene im Abschnitt 2.10.2 durchgeführt, mit dem Unterschied, dass die Ni-NTA Agarose durch das Kobalt Talon Resin ersetzt wurde.

### **2.10.4      Aufreinigung von TgOMP85<sup>91-256His</sup> mit Hilfe der Gelfiltrationsmethode**

Um eine möglichst reine Fraktion mit dem gewünschten Protein zu erhalten, wurde eine weitere Methode zur Aufreinigung Histidin markierter Proteine angewendet. Dabei handelte es sich um eine affinitätschromatographische Methode, bei der mit Hilfe einer Superdex 200 HR 10 / 30 Säule (GE Healthcare) die Aufreinigung durchgeführt wurde. Die Gelfiltration mit Hilfe der genannten Säule erlaubt eine Auftrennung von Proteinen mit einem Molekulargewicht von 10000–600000 Dalton. Vor der Aufreinigung wurde die Säule zunächst mit 50 mM Natriumdihydrogenphosphat (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), 300 mM Natriumchlorid (NaCl) und 50 mM Imidazol equilibriert. Die Gelfiltration wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt und die dabei eingestellte Durchflussgeschwindigkeit betrug 500 µl pro Minute. Die dabei entstandenen Fraktionen wurden anschließend für proteinbiochemische Analysen (SDS-PAGE) verwendet.

Neben der genannten Chromatographie wurde eine Ionenaustauschchromatographie zur Auftrennung der aufzureinigenden Proteine von Kontaminanten durchgeführt. Dabei wurde die sogenannte MonoQ Säule verwendet. Die Durchführung dieser Chromatographie wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt und die dabei eingestellte Durchflussgeschwindigkeit betrug ebenfalls 500  $\mu$ l pro Minute. Anschließend wurden die Fraktionen mit proteinbiochemischen Methoden analysiert.

### 2.11 Proteinbiochemische Methoden

#### 2.11.1 SDS-PAGE (nach Laemmli, 1970)

Die Sodiumdodecylsulfat (SDS)-Gelelektrophorese ist eine Methode zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht (MG). Je nach Größe des zu analysierenden Proteins verwendet man ein Polyacrylamidgel mit einer definierten Prozentigkeit, dessen Molekularsiebeffekt eine Auftrennung der geladenen Proteinmischung ermöglicht. Vor dem Beladen der Gels mit den Proteinproben wurden diese zunächst mit einem 2-fach konzentrierten Ladepuffer, welcher Di-Thiothreitol (DTT) enthält, in einem 1:1 Verhältnis versetzt und anschließend für ca. 10 Minuten bei 95°C aufgekocht. Durch diesen Schritt bindet das SDS an die durch das Aufkochen denaturiert vorliegenden, zu separierenden Proteine. Die negative Ladung erhalten die Proteine durch die an sie gebundenen SDS-Moleküle und wandern somit bei Anlegen einer Spannung (100 V für das Sammelgel und 130 V für das Trenngel) zur Kathode.

Die in dieser Arbeit verwendeten SDS-Gele wiesen eine Prozentigkeit von 7,5–15% auf.

#### 2.11.2 Comassiefärbung von SDS-Gelen

Um die nach ihrem MG voneinander getrennten Proteine in einem SDS-Gel sichtbar zu machen, kann man diese mit Hilfe einer Comassie Brilliant Blue G250-Lösung und Methanol anfärben. Dazu wurde das SDS-Gel nach der Elektrophorese in der Färbelösung über Nacht bei RT inkubiert. Am nächsten Tag wurde durch mehrstündiges Waschen mit  $\text{ddH}_2\text{O}$ , welches in regelmäßigen Abständen gewechselt wurde, die überflüssige Comassielösung entfernt und das Gel entfärbt. Proteinbanden bleiben bei diesem Vorgang blau gefärbt sichtbar.

### 2.11.3 Western-Blot (nach Towbin *et al.*, 1979)

Zur Visualisierung der Proteine kann neben der Comassiefärbung des SDS-Gels auch ein Western-Blot durchgeführt werden, bei der die aufgetrennten Proteine zunächst auf eine Nitrocellulosemembran (NC-Membran) transferiert werden und dort mit spezifischen, gegen sie gerichteten Primärantikörpern interagieren können. Durch den Einsatz von enzymgekoppelten Sekundärantikörpern und die Durchführung einer ECL- oder AP-Detektion können die Proteine schließlich visualisiert werden.

Für die Durchführung eines Western-Blots wurden zunächst drei zurechtgeschnittene Whatmanpapiere in Transferpuffer, welcher zur Aktivierung der NC-Membran mit Methanol versehen war, getränkt und auf den unteren Teil der Blotkammer gelegt. Auf diese Papiere wurden anschließend das SDS-Gel, die NC-Membran und drei weitere Whatmanpapiere geschichtet, wobei die beiden letzten Komponenten zuvor ebenfalls in den Transferpuffer getränkt wurden. Nach Verschließen der Blotkammer wurde eine Stromstärke von 1 mA/cm<sup>2</sup> für eine Stunde angelegt. Die NC-Membran mit den darauf transferierten Proteinen wurde zur Kontrolle des Transfererfolgs für einige Minuten bei RT in einer Ponceaufärbelösung inkubiert. Anschließend wurde diese Lösung verworfen und die Membran auf Proteinbanden überprüft. Die NC-Membran wurde mit Tris-Sal-Lösung entfärbt. Danach folgte das einstündige Blocken mit 5% Milchpulver in PBS, pH 7,4 und die Inkubation mit den entsprechenden Primärantikörpern über Nacht. Am darauf folgenden Tag wurden drei Waschschrte mit einer Tris-Sal-Lösung durchgeführt, auf die eine zwei stündige Inkubation mit den gewählten Zweitantikörpern folgte. Auch hier schließen sich drei weitere Waschschrte an. Je nach Enzym, welches an den Sekundärantikörper gebunden ist, wurde entweder eine ECL- oder AP-Detektion zur Visualisierung der aufgetrennten Proteine durchgeführt.

### 2.11.4 MALDI-TOF MS Analysen zur Proteinidentifikation

Die Matrix-unterstützte Laserdesorptions / Ionisations-Massenspektrometrie stellt ein Verfahren zur Analyse und Identifikation Proteinen dar, welche von Hillenkamp und Karas entwickelt wurde und auf der Ionisation der zu analysierenden Moleküle basiert. Wichtige Komponenten des Massenspektrometers sind die Ionenquelle, der Flugzeitanalysator, welcher als Massenanalysator fungiert, und der Detektor. Für die Durchführung einer MALDI-TOF Analyse muss zunächst eine Kokristallisation des zu untersuchenden Proteingemisches mit einer sogenannten Matrix durchgeführt werden. Dabei wird die Probe mit der Matrix vermischt und auf ein sogenanntes Target aufgebracht. Diese Matrix stellt eine organische

Säure dar, die nach Laserstrahlung absorbiert und die dann ionisierten Peptide freisetzt. Aufgrund der Ionisation erlangen die Proteine eine definierte Ladung und können so nach ihrer Beschleunigung in einem elektrostatischen Feld und dem Durchlaufen einer feldfreien Driftstrecke auf ihr Masse / Ladungs-Verhältnis analysiert werden. Die Bestimmung der einzelnen Proteinmassen erfolgt dann mit Hilfe der Flugzeit und der Flugstrecke, die die Ionen zurückgelegt haben.

Proben, die in dieser Arbeit einer solchen MALDI-TOF Analyse unterzogen wurden, entstammten entweder präparativen SDS-Gelen oder einer der oben beschriebenen Elutionsfraktionen nach der Proteinaufreinigung. Die Analysen dieser Proben wurden von Jörg Kahnt (MPI Marburg) durchgeführt.



### 3 Ergebnisse

Der Transport Zellkern-kodierter Proteine in die sekundäre Plastide der apikomplexen Parasiten ist Gegenstand zahlreicher Forschungsarbeiten. Aufgrund seiner vier Membranen stellt der Apikoplast ein hochkomplexes Organell dar und benötigt für den Import dieser Proteine eine Transportmaschinerie. Wie der Transport über die einzelnen Membranen im Detail aussieht, ist bis zum jetzigen Zeitpunkt größtenteils ungeklärt. Jedoch gibt es Hinweise darauf, dass dieser vermutlich über einen Vesikeltransport zwischen dem ER und der sekundären Plastide (DeRocher *et al.*, 2008; Tonkin *et al.*, 2006), einem ERAD-ähnlichen System in der zweiten (Agrawal *et al.*, 2009, Spork *et al.*, 2009) und einem Tic-Homolog in der vierten Apikoplastenmembran (van Dooren *et al.*, 2008) stattfindet. Gegenstand dieser Arbeit ist die Frage, wie der Proteintransport über die dritte Apikoplastenmembran von *T. gondii* ermöglicht wird.

#### 3.1 Identifizierung eines OMP85-Homologs in *Toxoplasma gondii*

Wie zuvor erwähnt, ist der molekulare Mechanismus des Transports von Proteinen über die dritte Apikoplastenmembran des Parasiten *T. gondii* noch weitestgehend unklar. Basierend auf der Arbeit von Bullmann und Kollegen soll in dieser Arbeit geklärt werden, ob das von ihnen durch bioinformatische Analysen im Genom von *T. gondii* identifizierte OMP85-Homolog (TgOMP85) tatsächlich Teil des Proteintransportsystems in der dritten Apikoplastenmembran darstellt (Bullmann *et al.*, 2010) und ob es, wie das von ihnen analysierte OMP85-Homolog der Diatomee *P. tricornutum*, ebenfalls eine Funktion beim Import von Proteinen in die sekundäre Plastide innehaben könnte. Dazu wurden zunächst einige Lokalisationsstudien mit Hilfe von Immunfluoreszenz Analysen (IFA) durchgeführt, um zu überprüfen, ob das durch Genomanalysen identifizierte TgOMP85 im Apikoplasten von *T. gondii* lokalisiert ist. Eine solche Lokalisation ist für ein putatives Transportprotein des Apikoplasten grundlegend. Beim positiven Befund einer plastidären Lokalisation, sollte anschließend durch IFA und den Einsatz des sogenannten Self-Assembling Split GFP Systems die intraorganelle Lokalisation weiter differenziert werden. Da das von Bullmann identifizierte PtOMP85 in der dritten Plastidenmembran der Diatomee *P. tricornutum* nachgewiesen wurde, sollte bei vorliegender Homologie, das TgOMP85 ebenfalls dort lokalisierbar sein.

### 3.2 Überprüfung des TgOMP85-Genmodells

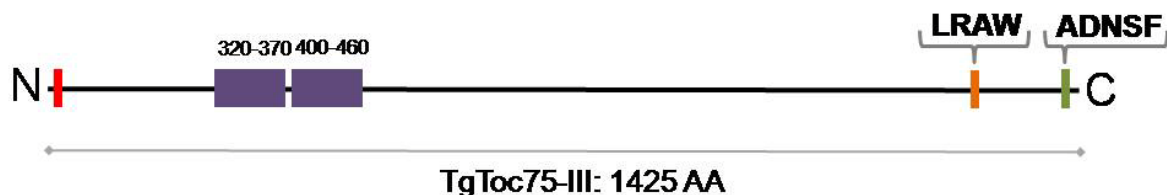
Das von Bullmann *et al.* (2010) im Genom von *T. gondii* identifizierte TgOMP85 Gen (Accession Number: gi 237833148) umfasst eine Sequenz von 4278 bp Länge. Das von ihm kodierte Protein mit einer Länge von 1425 aa hat eine erwartete Masse von 149 kDa.

Nach der Identifizierung des TgOMP85-Gens sollte zunächst überprüft werden, ob es sich bei dem kodierten Protein tatsächlich um ein Mitglied der OMP85-Familie handelt. Um die Zugehörigkeit von TgOMP85 zur OMP85-Familie zu belegen, wurde das Protein dahingehend überprüft, ob es die für Mitglieder der OMP85-Familie charakteristischen, konservierten Strukturen und Motive enthält und wenn ja, in wie weit diese mit den üblichen Domänen übereinstimmen. Beispiele für konservierte Strukturen sind die für OMP85 Mitglieder typischen POTRA-Domänen am N-Terminus und die  $\beta$ -Barrel-Domäne am C-Terminus, die zwar in ihrer Aminosäuresequenz nicht konserviert sind, jedoch in ihrer Konformation (Sanchez-Pulido *et al.*, 2003). Wie bereits erwähnt, weisen OMP85-Proteine an ihrem C-terminalen Ende eine  $\beta$ -Barrel Struktur auf, die aus einzelnen  $\beta$ -Faltblättern besteht, die über lösliche Loops miteinander verbunden sind (Schulz, 2000; Schleiff und Soll, 2005). Das OMP85-Homolog aus *T. gondii* weist sowohl die  $\beta$ -Faltblätter als auch die zugehörigen Loops auf, jedoch unterscheiden sich die Loops von denen anderer OMP85 Proteine bezüglich ihrer Größe. Während die Loops anderer OMP85 Mitglieder kürzer sind, scheinen die von TgOMP85 deutlich größer zu sein (persönliche Mitteilung von Dr. Oliver. Mirus).

Wie bei der Translokationspore Toc75-III des Toc-Komplexes in Chloroplasten oder dem OMP85-Homolog der Diatomee *P. tricornutum* findet man auch bei TgOMP85 zwei POTRA-Domänen am N-Terminus. Dieser Befund ist charakteristisch für OMP85 Mitglieder, die eine Funktion während des Proteintransports einnehmen. Sogenannte „Polypeptid transportierende  $\beta$ -Barrel Proteine“ (PTB) werden aufgrund ihrer Funktion in zwei Klassen gegliedert. Während Proteine der 1. Klasse im Proteintransport involviert sind, wird Proteinen zweiter Klasse eine Funktion in der Integration von  $\beta$ -Barrel Proteinen in Membranen zugewiesen (Koenig *et al.*, 2010). Dies impliziert eine mögliche Beteiligung von TgOMP85 am Proteintransport in den Apikoplasten. In TgOMP85 befinden die beiden POTRA-Domänen in den Bereichen zwischen der 320. und 370. bzw. der 400. und 460. Aminosäure des Proteins und könnten wie POTRA-Domänen anderer OMP85 Proteine möglicherweise bei der Substraterkennung eine wichtige Rolle spielen (Bos *et al.*, 2007). Obwohl das OMP85-Homolog im Apikoplasten von *T. gondii* nur zwei dieser Domänen besitzt, gibt es Hinweise darauf, dass das OMP85-Homolog des Vorfahren der Rhodophyten drei statt zwei POTRA-Domänen aufwies. Letzterer stellt den Organismus dar, aus dem u.a. der Apikoplast nach einer sekundären Endosymbiose hervorging. Da die meisten Toc75-Homologe jedoch nur

noch zwei dieser Domänen aufweisen, liegt die Vermutung nahe, dass eine der drei Domänen bereits vor dem Ereignis der sekundären Endosymbiose verloren gegangen sein könnte (persönliche Mitteilung von Prof. Enrico Schleiff).

Weitere konservierte Motive, die wichtige Komponenten von TgOMP85 darstellen und im Gegensatz zu den POTRA-Domänen am C-terminalen Ende des Proteins vorliegen (Abbildung 3-1), sind zum einen das bei *T. gondii* so bezeichnete LRAW-Motiv, eine Abwandlung des VRGY-Motivs, welches für das Protein FhaC, einem Mitglied der OMP85-Familie gram-negativer Bakterien, beschrieben wurde (Delattre *et al.*, 2010). Dieses ist Teil des sogenannten „Two-Partner Secretion systems“ und beeinflusst sowohl die Struktur als auch die Funktion dieses Transportproteins, wie durch Mutationsanalysen bestätigt wurde (Delattre *et al.*, 2010). Zum anderen findet sich am C-Terminus außerdem das sogenannte ADNSF-Motiv; welches eine Abwandlung des ADFDF-Motivs darstellt. Das ADFDF-Motiv findet sich als Konsensusmotiv am C-terminalen Ende von OMP85 ähnlichen Proteinen bei Cyanobakterien (Wunder *et al.*, 2007). Bei beiden handelt es sich letztlich um hydrophobe Motive, die wichtig für die Funktionalität der jeweiligen Proteine sind.



**Abbildung 3-1: Genmodell des TgOMP85-Homologs**

Wie viele OMP85-Proteine weist das TgOMP85 von *T. gondii* konservierte Motive und Strukturen auf, die für die Funktionalität des Proteins essentiell sind. Zu diesen Strukturen zählen neben den  $\beta$ -Faltblättern, welche am C-Terminus die eigentliche Pore des Proteins ausbilden, auch die sogenannten POTRA-Domänen, von denen man zwei im N-terminalen Bereich (320-370 aa bzw. 400-460 aa) von TgOMP85 vorfindet. Weitere konservierte Motive findet man im C-terminalen Part von TgOMP85. Dabei handelt es sich einerseits um das LRAW-Motiv, was als hydrophober Bereich wichtig für die Funktionalität des Proteins ist, andererseits um das ADNSF-Motiv, das mit Phenylalanin als letzte Aminosäure eine bedeutende Rolle in der Erkennung von bzw. Interaktion mit Proteinen und deren Einbau in die entsprechende Apikoplastenmembran einnehmen könnte.

Bei ADNSF handelt es sich um ein Motiv, welches das C-terminale Ende von TgOMP85 repräsentiert und sich durch den Besitz eines terminalen Phenylalanins (Phe, F), einer stark hydrophoben, aromatischen Aminosäure auszeichnet. Der Besitz eines Phenylalanins oder einer anderen hydrophoben Aminosäure an dieser Position lässt sich auch bei zahlreichen anderen Mitgliedern der OMP85-Familie unterschiedlicher Funktionen wiederfinden. Diese Konservierung weist auf eine wichtige Funktion dieser Aminosäure an dieser Position hin.

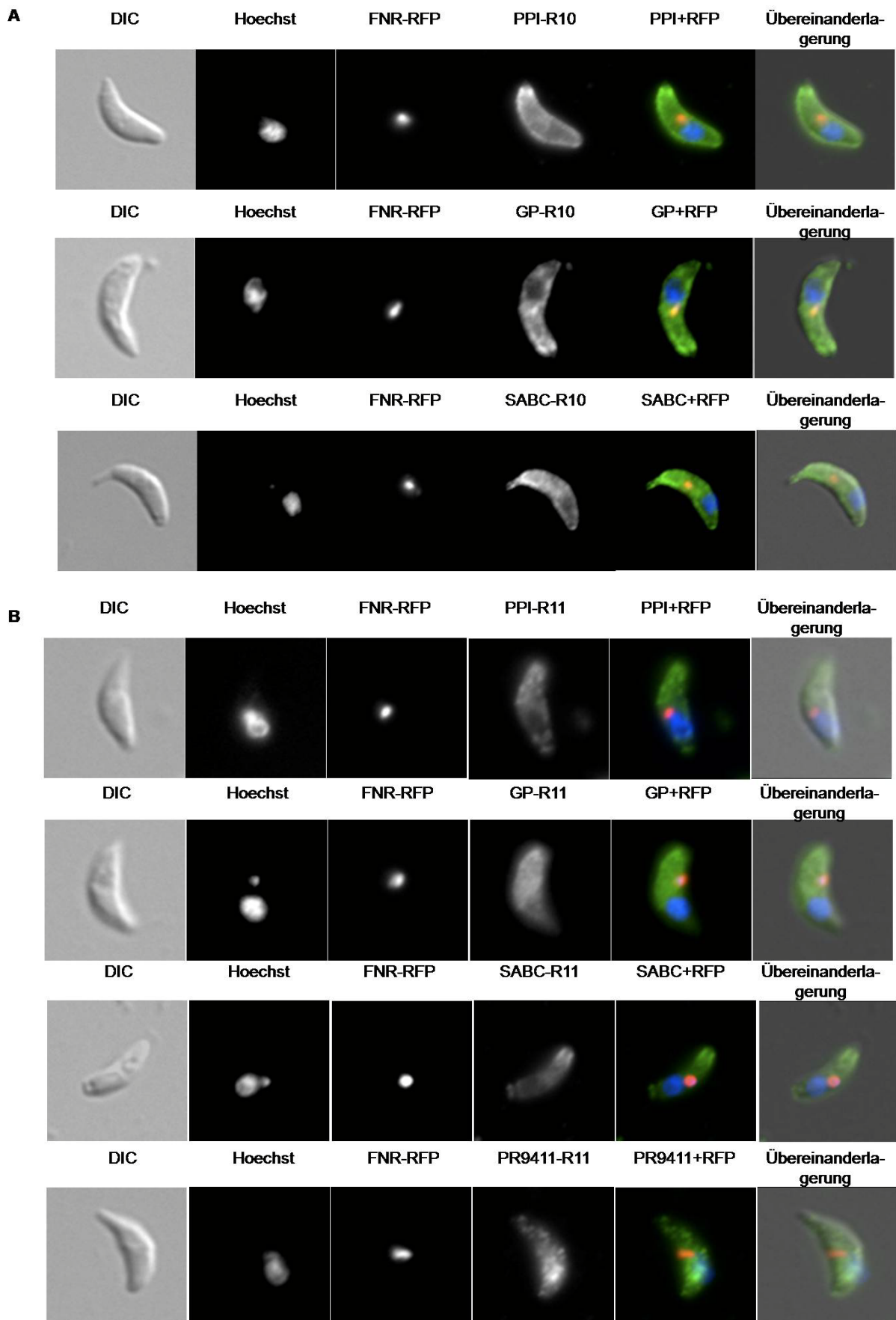
Für PhoE aus *E. coli*, einem Protein, welches in der äußeren Bakterienmembran vorzufinden ist, konnten Struyvé und Kollegen für das Phenylalanin und den davor gelegenen, hydrophoben Part eine essentielle Funktion nachweisen (Struyvé *et al.*, 1991). In dieser Arbeit wurde durch Mutations- und Lokalisationsanalysen gezeigt, dass der genannte Bereich wichtig für die Assemblierung und Integration von Proteinen in die äußere Bakterienmembran ist. Robert und Kollegen konnten in ihren Studien zeigen, dass das gleiche C-terminale Motiv bzw. das darin enthaltene Phenylalanin eine wichtige Rolle bei der Erkennung von in die Membran zu integrierenden, bakteriellen OMP durch OMP85 einnimmt (Robert *et al.*, 2006). Die Identifikation des Phenylalanins beziehungsweise des ADNSF-Motiv in TgOMP85 bekräftigt die Hypothese, dass es sich bei TgOMP85 tatsächlich um ein OMP85-Homolog handelt.

Ausgehend von dem hier gezeigten Genmodell und den aufgeführten Vergleichen bezüglich der einzelnen Domänen und Motive lässt sich vermuten, dass trotz einiger Abweichungen TgOMP85 eindeutig der OMP85-Familie zuzuordnen ist.

#### **3.3 Lokalisation und Detektion von endogenem TgOMP85**

Nachdem TgOMP85 eindeutig der OMP85-Familie zugeordnet werden konnte, galt es das endogene TgOMP85 von *T. gondii* auf seine subzelluläre Lokalisation hin zu überprüfen. Aus diesem Grund wurden Antiseren beziehungsweise aufgereinigte Antikörper von der Firma Eurogentech bezogen, die aus zwei immunisierten Kaninchen gewonnen wurden. Zur Immunisierung wurde ein von der Firma Eurogentech ausgewähltes und synthetisiertes Peptid verwendet, welches den Bereich zwischen der 682. und 696. Aminosäure von TgOMP85 umfasst. Um die Lokalisation des endogenen TgOMP85 bestimmen zu können, wurden IFA an Tachyzoiten von *T. gondii* durchgeführt. Als erstes wurden die Präimmunseren für die Lokalisationsstudien getestet. Da es sich bei diesen um vor der Immunisierung gewonnenes Material handelte, sollten bei diesen im Vergleich zu den Antiseren aus der großen und finalen Blutung beziehungsweise den aufgereinigten Antikörpern, keinerlei Signale zu erwarten sein. Die in Abbildung 3-2A dargestellten Ergebnisse zeigen jene Fluoreszenzbilder, die mit den Antiseren des immunisierten Kaninchens Nr. 10 generiert wurden, wohin gegen die in 3-2B gezeigten Fluoreszenzen mit Hilfe der Antiseren beziehungsweise den aufgereinigten Antikörpern aus Kaninchen Nr. 11 gewonnen wurden.

### 3 Ergebnisse



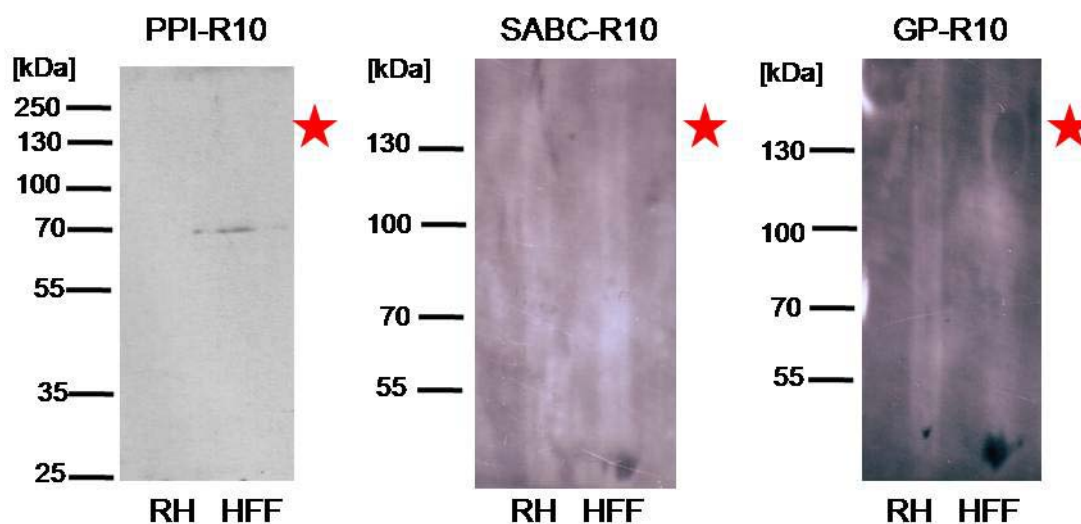
**Abbildung 3-2: Ergebnis der IFA mit den Antiseren der beiden immunisierten Kaninchen Nr.10 und 11**

Zur Lokalisation des endogenen TgOMP85 wurden Antiseren beziehungsweise Antikörper verwendet, die von der Firma Eurogentech generiert wurden. Bei den unter A) dargestellten Abbildungen wurden das Präimmunserum und die beiden Seren aus der großen und letzten Blutung des immunisierten Kaninchens Nr. 10 getestet. Zur Visualisierung des Nukleus wurde eine Färbung mit Hoechst durchgeführt. Um die vermutete, plastidäre Lokalisation überprüfen zu können, wurde eine Kolo-kalisation mit dem stromalen Markerprotein FNR durchgeführt. In den unter B) dargestellten Abbildungen wurden hingegen das Präimmunserum, die beiden Seren der großen und letzten Blutung und der aufgereinigte Antikörper des Kaninchens Nr.11 für die IFA verwendet. Alle Seren und Antikörper wurden in einer 1:50 Verdünnung eingesetzt. GP: Große Blutung; PPI: Präimmunserum; PR: Aufgereinigter Antikörper; SABC: Letzte Blutung.

Um eine Aussage darüber treffen zu können, ob die verwendeten Antiseren beziehungsweise Antikörper spezifisch an das endogene TgOMP85 binden, und um gleichzeitig die vermutete, plastidäre Lokalisation nachzuweisen, wurde eine Kolo-kalisation mit dem stromalen Apikoplastmarker Ferredoxin  $\text{NADP}^+$  Oxidoreduktase (FNR), welches fusioniert an das rot fluoreszierende Protein (RFP) vorlag, durchgeführt (das für FNR-RFP kodierende Plasmid wurde freundlicherweise von Dr. Markus Meissner zur Verfügung gestellt). Wie in 3-2A erkennbar ist, führte die Inkubation der Proben mit den Antiseren aus Kaninchen Nr. 10 eindeutig zu Signalen in der Peripherie einzelner Parasiten. Diese Signale weisen dabei aber kaum auf eine eindeutige Apikoplastenlokalisation hin. Eine solche findet sich, unter Vorbehalt, nur in Antiserum GP-R10. Dies wird bei einem Vergleich mit dem rot dargestellten Signal des Apikoplastenmarkerproteins (FNR-RFP) sehr deutlich. Da das von den Antiseren generierte Signal bereits bei der Analyse mit dem Präimmunserum zu sehen war, weist dieses Ergebnis auf eine unspezifische Reaktion aller gewonnenen Seren von Kaninchen Nr. 10 hin, so dass diese im Anschluss nicht weiter für diesen experimentellen Ansatz der Immunfluoreszenz verwendet werden konnten. Wie Abbildung 3-2B zeigt, konnte jedoch auch mit den aus Kaninchen Nr. 11 gewonnen Antiseren beziehungsweise aufgereinigten Antikörpern nur ein unspezifisches, nicht mit dem Apikoplasten überlappendes Signal gewonnen werden. Somit erwiesen sich sämtliche gegen das endogene TgOMP85 generierte Antiseren aus Kaninchen für die Lokalisationsstudien als untauglich.

Um die Funktionalität der generierten Antiseren in Bezug auf proteinbiochemische Analysen, wie z.B. Western-Blots, zu testen, wurden Totallysate von Tachyzoiten hergestellt. Um eine mögliche Spezifität der Antiseren und Antikörper in diesen Untersuchungsmethoden verifizieren zu können, wurden als Negativkontrolle auch Totallysate von nicht infizierten, humanen Vorhautfibroblasten (Human foreskin fibroblasts, HFF) analysiert. Die Größe der erwarteten Bande von TgOMP85 liegt bei einer Masse von 149 kDa.

Betrachtet man zunächst die mit den Antiseren des Kaninchens Nr. 10 detektierten Western-Blots (Abbildung 3-3), so sind folgende Ergebnisse zu erkennen. Das Präimmunserum (PPI-R10) konnte kein Protein im Totallysat der Parasiten erkennen, jedoch reagierte es mit dem Lysat der HFF. Wie bereits erwähnt, sind bei Einsatz der Präimmunseren keine Signale zu erwarten, da jedoch ein Signal auf der Höhe von ~70 kDa in der Negativkontrolle zu detektieren war, lässt dieses Ergebnis vermuten, dass im Präimmunserum Antikörper vorhanden waren, die mit endogenen Proteinen der HFF kreuzreagiert haben. Analysiert man die Ergebnisse, die man aus den mit den bei den Antiseren der großen (GP-R10) beziehungsweise finalen Blutung (SABC-R10) detektierten Western-Blots erhalten hat, so finden sich weder in den Totallysaten der Tachyzoiten (RH-Stamm, RH) noch in den Lysaten der HFF Banden.

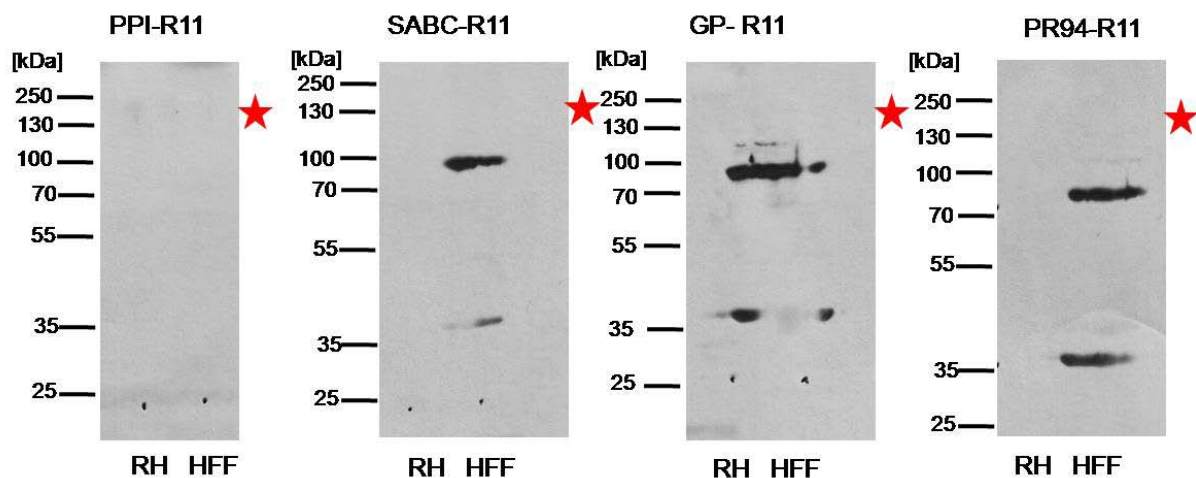


**Abbildung 3-3: Biochemische Analyse der Totallysate von Tachyzoiten und humanen Vorhautfibroblasten mit Hilfe der gegen TgOMP85 generierten Antiseren aus Kaninchen Nr. 10**

Zum Nachweis des endogenen TgOMP85 (erwartete Laufhöhe von 149 kDa mit ★ gekennzeichnet) wurden Totallysate von Tachyzoiten (RH) und HFF mit Hilfe von SDS-PAGE und Western-Blots analysiert. Pro Spur wurden 10\*7 Zelläquivalente geladen. Die hierbei verwendeten Seren [Präimmunserum (PPI-R10), Antiserum aus der großen (GP-R10) und der finalen Blutung (SABC-10)] stammten aus Kaninchen Nr. 10 und wurden in einer 1:50 Verdünnung eingesetzt.

Dieses Ergebnis zeigt, dass keines der Antiseren aus Kaninchen Nr. 10 das endogene TgOMP85 im Western-Blot erkennen konnte, und bes. tätigt somit die Ergebnisse der Immunfluoreszenzen, in denen die Detektion des Proteins ebenso wenig möglich war, jedoch Kreuzreaktionen auftraten.

Ein anderes, jedoch ebenfalls negatives Ergebnis ließ sich in den Analysen beobachten, die mit den Antiseren und aufgereinigten Antikörpern aus dem zweiten, immunisierten Kaninchen, Nr. 11, durchgeführt wurden. Im Gegensatz zum Präimmunserum aus Kaninchen Nr. 10 (PPI-R10), mit welchem sich im HFF-Totallysat eine 70 kDa Bande detektieren ließ, wurde mit dem Präimmunserum des anderen Kaninchens (PPI-R11) keine Reaktion mit Proteinen der Negativkontrolle nachgewiesen (Abbildung 3-4). Betrachtet man jedoch die Ergebnisse, die man durch die Inkubation der Blots mit den Antiseren der großen (GP-R11) und finalen Blutung (SABC-R11) gewonnen hat, so wird erneut eine Kreuzreaktion der Antiseren mit Proteinen der Wirtszelle offenbar. In diesem Fall ließ sich eine Bande mit einer Masse von ca. 40 kDa, beziehungsweise eine weitere mit einer ungefähren Masse von 80-90 kDa detektieren. Somit ließen sich weder mit den Antiseren, noch mit den aufgereinigten Antikörpern aus Kaninchen Nr. 11 Banden in den Western-Blots mit aufgetrennten Totallysaten von Tachyzoiten detektieren, die dem endogenen TgOMP85 entsprechen könnten.



**Abbildung 3-4: Biochemische Analyse der Totallysate von Tachyzoiten und humanen Vorhautfibroblasten mit Hilfe der gegen TgOMP85 generierten Antiseren aus Kaninchen Nr. 11**

Zum Nachweis des endogenen TgOMP85 (erwartete Laufhöhe von 149 kDa mit ★ gekennzeichnet) wurden Totallysate von Tachyzoiten (RH) und HFF mit Hilfe von SDS-PAGE und Westen-Blots analysiert. Pro Spur wurden 10\*7 Zelläquivalente geladen. Die hierbei verwendeten Seren [Präimmunserum (PPI-R11), Antiserum aus der großen (GP-R11) und der finalen Blutung (SABC-11)] und der verwendete, aufgereinigte Antikörper (PR94-R11) stammten aus Kaninchen Nr. 11 und wurden in einer 1:50 Verdünnung eingesetzt.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass mit Hilfe der verwendeten Antiseren beziehungsweise dem aufgereinigten Antikörper der Firma Eurogentech der



proteinbiochemische Nachweis des endogenen TgOMP85 nicht möglich war und dessen Lokalisation in *T. gondii* nicht bestimmt werden konnte. Daher muss versucht werden, diese Fragestellungen mit Hilfe anderer Methodiken zu beantworten.

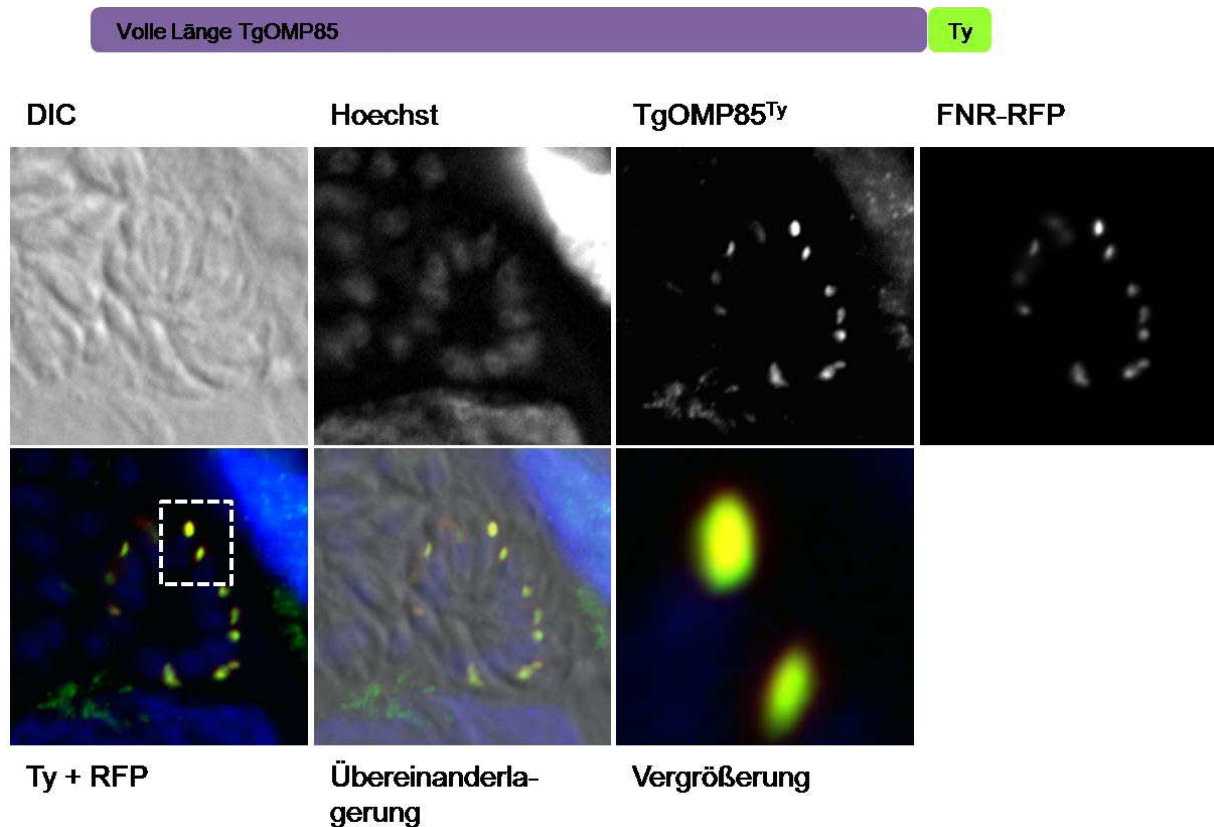
#### **3.4 Lokalisation von TgOMP85<sup>Ty</sup> im Apikoplast von *T. gondii***

Wie im vorherigen Abschnitt dargestellt, konnte das endogene TgOMP85 mit Hilfe der dort verwendeten Antiseren in den Tachyzoiten nicht lokalisiert werden. Daher soll im Weiteren versucht werden, ein Fusionsprotein aus TgOMP85 und dem Ty-Protein in transient transfizierten Tachyzoiten nachzuweisen.

Für diese Lokalisationsstudien des TgOMP85 Proteins voller Länge wurde versucht, die hierfür kodierende Sequenz sowohl durch Standard-PCR, Overlapping-PCR als auch durch Reverse Transkription-PCR zu amplifizieren. Jedoch gelang es innerhalb dieser Arbeit nicht, die kodierende Sequenz zu amplifizieren, so dass die Klonierungsarbeiten von der Firma Geneart durchgeführt wurden. Hierbei wurde die kodierende Sequenz synthetisiert und über die beiden Schnittstellen *EcoRI* und *NsiI* in den TUB8mycGFPMyoATy-HX\_117 (V117) Vektor ligiert. Am C-terminalen Ende der kodierenden Sequenz für das Protein befindet sich zudem zwischen der *NsiI*- und *PacI*- Schnittstelle ein Ty-Tag, welches für die anstehende Detektion bzw. Lokalisationsuntersuchung genutzt werden konnte. Zur anschließenden Lokalisation des Proteins im Parasiten wurde das oben genannte Plasmid transient in *T. gondii* transfiziert. 48 Stunden nach erfolgter Transfektion wurde eine IFA durchgeführt. Um eine Aussage zur möglichen Lokalisation des volle Länge TgOMP85 Proteins in der sekundären Plastide machen zu können, wurde eine Koloalisation mit dem Apikoplastenmarkerprotein FNR (FNR-RFP) untersucht, welches eine Komponente des Redoxsystems im Apikoplasten darstellt (Singh und Bhakuni, 2008) und wie die entsprechenden FNR aus Prokaryoten, Mitochondrien und Plastiden für den Austausch von Redoxäquivalenten zwischen NAD(P)(H) und [2Fe2S] Ferredoxinen verantwortlich ist (Carrillo und Ceccarelli, 2003).

Das Ergebnis dieser Untersuchung ist in Abbildung 3-5 zu sehen. Betrachtet man zunächst die Signale, die von dem Ty-markierten TgOMP85 (TgOMP85<sup>Ty</sup>) stammen, so werden punktförmige Strukturen deutlich, die kleiner sind als das Signal der Nuklei einzelner Parasiten, welche durch Hoechst Färbung sichtbar gemacht wurden. Vergleicht man anschließend das Signal von TgOMP85<sup>Ty</sup> mit dem von FNR-RFP, so wird eine starke Ähnlichkeit sowohl in der Struktur als auch in der Lokalisation ersichtlich. Dies deutet darauf

hin, dass TgOMP85<sup>Ty</sup> tatsächlich in der sekundären Plastide des Parasiten *T. gondii* lokalisiert ist.

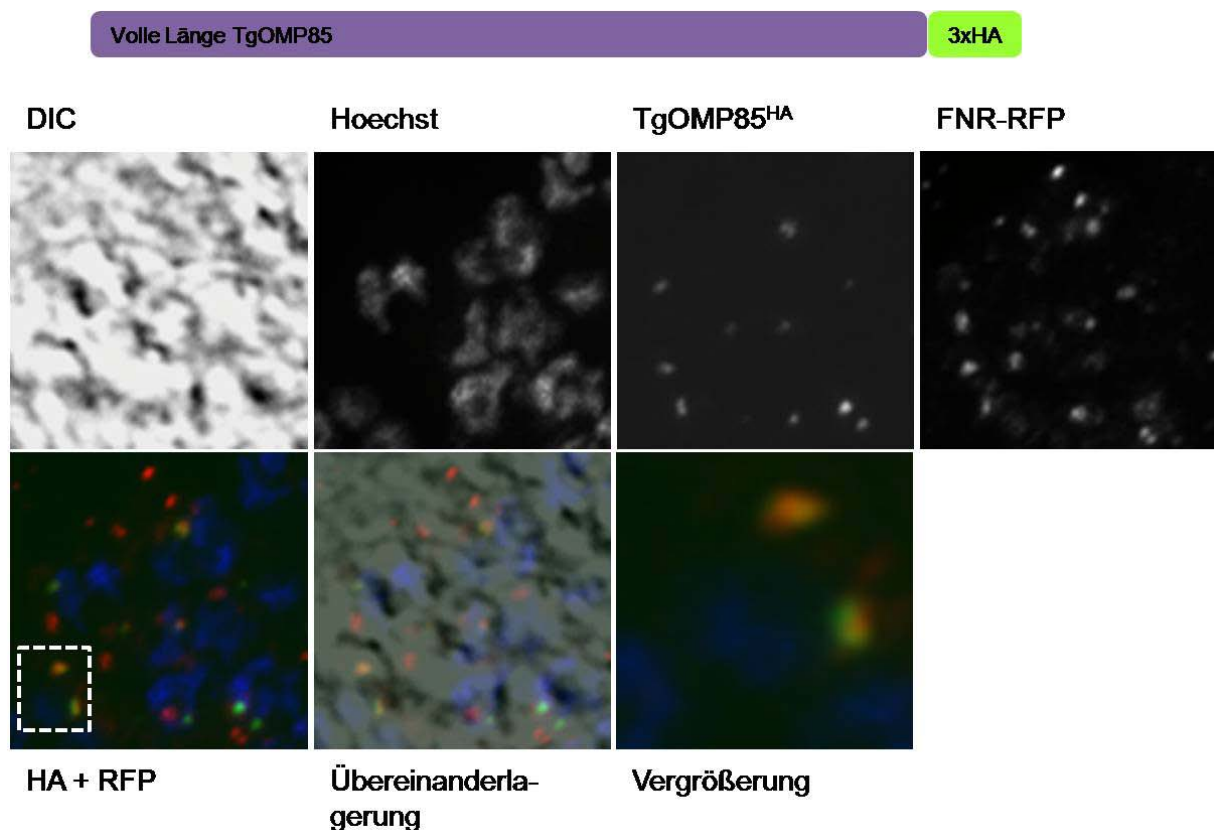


**Abbildung 3-5: Lokalisation von TgOMP85<sup>Ty</sup> im Apikoplasten von *T. gondii***

Zur Bestimmung einer möglichen Lokalisation von TgOMP85<sup>Ty</sup> im Apikoplasten von *T. gondii* wurde mit Hilfe einer IFA eine Kolo­kalisation mit FNR-RFP durchgeführt. Zur Visualisierung der Zellkerne wurde eine Färbung mit Höchst vorgenommen. Bei einem Vergleich des Signals von TgOMP85<sup>Ty</sup> mit dem des FNR-RFP wird eine ausgeprägte Überlappung beider Signale deutlich.

Um zu verdeutlichen, dass die Lokalisation unabhängig von der am C-Terminus fusionierten Markierung ist, wurde der Ty-Tag gegen einen anderen Tag, bestehend aus drei hintereinander geschalteten Hämagglutinin-Tags (3xHA), ausgetauscht. Das Plasmid, welches nun für dieses Fusionsprotein (TgOMP85<sup>HA</sup>) kodiert, wurde ebenfalls transient transfiziert und die Lokalisation mit Hilfe von IFA bestimmt. Wie im Falle des Ty-markierten TgOMP85 wurde dazu eine Kolo­kalisation mit FNR-RFP untersucht und eine Höchstfärbung der Parasiten­zellkerne durchgeführt (Abbildung 3-6).

Bei Betrachtung der so gewonnenen Daten wird deutlich, dass das Signal von FNR-RFP im Vergleich zu dem von TgOMP85<sup>HA</sup> quantitativ überwiegt. Dies deutet möglicherweise auf eine unterschiedliche Transfektionseffizienz bzw. Expressionsstärke beider Konstrukte hin. Dennoch konnte eine Kolokalisation zwischen dem 3xHA markierten TgOMP85 und dem Markerprotein des Apikoplasten beobachtet werden, welche sich nicht von der für die Ty-getaggte Variante unterscheidet.



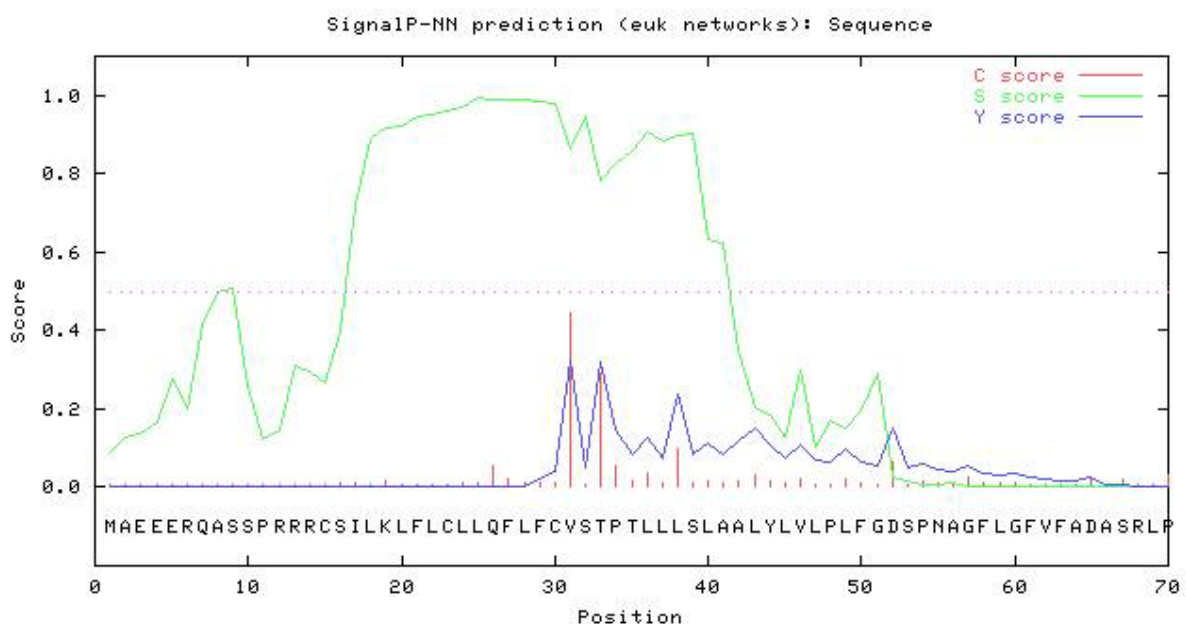
**Abbildung 3-6: Lokalisation von TgOMP85<sup>HA</sup> im Apikoplasten von *T. gondii***

Die Unabhängigkeit der Lokalisation des volle Länge Proteins TgOMP85 von dem am C-terminalen Ende fusionierten Tag wurde durch den Austausch der Ty-Markierung untersucht. Die Färbung der Parasitenzellkerne erfolgte durch Höchst. Die Kolokalisation von TgOMP85<sup>HA</sup> mit FNR-RFP ergab auch hier eine klare Übereinstimmung bezüglich der Struktur und Lokalisation beider Proteine.

In Bezug auf die Lokalisation von TgOMP85 in *T. gondii* konnte gezeigt werden, dass das Protein tatsächlich im Apikoplasten vorliegt. Des Weiteren konnte durch den Austausch des Tags demonstriert werden, dass diese beobachtete Lokalisation unabhängig von der verwendeten Markierung erfolgt.

### 3.5 Die Funktion des N-terminalen Bereiches von TgOMP85 beim Transport in den Apikoplasten

Die meisten Apikoplastenproteine besitzen an ihrem N-Terminus eine für den Transport verantwortliche BTS-Sequenz, die sich aus einem Signal (SP)- und einem Transitpeptid (TP) zusammensetzt (Bolte *et al.*, 2009). Da in dieser Arbeit mit Hilfe von IFA für das Ty- bzw. HA-markierte TgOMP85 eine eindeutige Lokalisation im Apikoplasten nachgewiesen werden konnte, sollte in weiteren Experimenten überprüft werden, ob sich im N-terminalen Bereich von TgOMP85 ebenfalls eine BTS-Sequenz finden lässt, und ob diese den Transport bzw. die Lokalisation des Proteins zur sekundären Plastide vermittelt. Für diese Studie wurde der N-terminale Bereich von TgOMP85 mit Hilfe einiger Programme [wie z.B. SignalP und Prediction of Apicoplast-Targeted Sequences (PATS)] nach einer BTS-Sequenz hin überprüft. Die Analyse mit PATS (Zuegge *et al.*, 2001) ergab, dass TgOMP85 vermutlich kein Apikoplastenprotein darstellt und keine vorhersagbare BTS-Sequenz aufweist. Jedoch ergab die Untersuchung mit SignalP (Nielsen *et al.*, 1997) ein vorhergesagtes SP.



**Abbildung 3-7: Vorhersage eines SP im N-Terminus von TgOMP85**

Mit Hilfe des Programms SignalP konnte am N-Terminus ein SP vorhergesagt werden, das offensichtlich die ersten 50 Aminosäuren von TgOMP85 umfasst (erkennbar anhand des **S scores**) und zwischen der 30. und 31. Aminosäure abgespalten wird (siehe **C score**).

Wie man in der Vorhersage der Abbildung 3-7 anhand des S-Scores (**S score**) erkennen kann, umfasst das SP die ersten ~50 Aminosäuren von TgOMP85 und wird offensichtlich

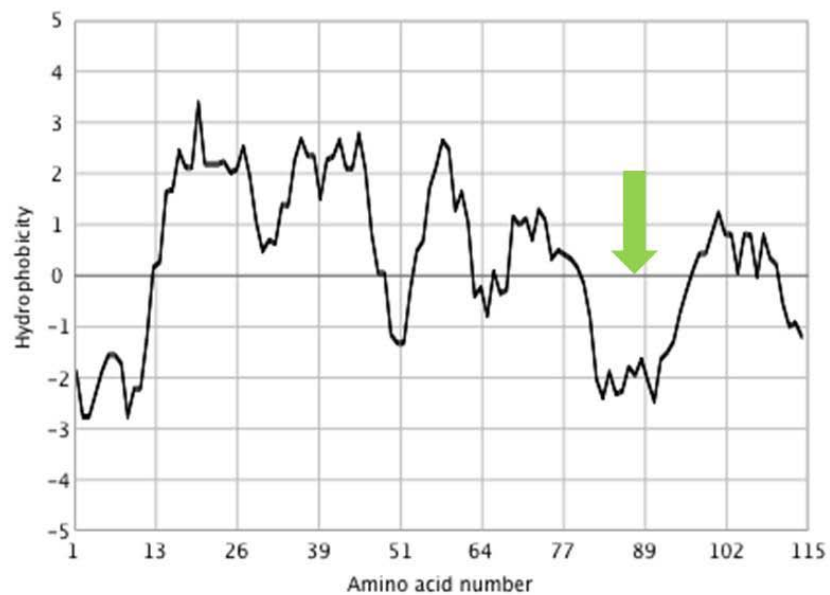
zwischen der 30. und 31. Aminosäure abgespalten (erkennbar anhand des **C scores**). Dieses Ergebnis impliziert möglicherweise die Präsenz einer funktionellen BTS-Sequenz im N-Terminus von TgOMP85.

Bullmann *et al.* (2010) konnten im N-Terminus von PtOMP85 neben der BTS-Sequenz eine weitere Region identifizieren, die für die intraorganelle Steuerung von PtOMP85 verantwortlich ist. Diese Region befindet sich zwischen der ~70. und 80. Aminosäure und weist einen hydrophilen Charakter auf. Da, wie bereits erwähnt, im Terminus von TgOMP85 keine vorhersagbare BTS-Sequenz, jedoch ein SP, identifiziert wurde, das auf ein mögliches, funktionelles Zielsteuerungselement hinweisen könnte, sollte basierend auf den eben geschilderten Ergebnissen von Bullmann *et al.* der N-terminale Part von TgOMP85 ebenfalls nach eindeutigen, hydrophilen Bereichen überprüft werden. Liegt ein ähnlich hydrophiler Bereich vor, so sollte weiter untersucht werden, ob dieser Einfluss auf den Transport bzw. die Lokalisation von TgOMP85 ausübt. Mit Hilfe des Kyte-Doolittle-Hydropathie Plots (Kyte & Doolittle, 1982) sollte daher der N-Terminus von TgOMP85 auf hydrophile Bereiche hin überprüft werden und das daraus resultierende Ergebnis mit dem Hydropathieplot des N-Terminus von PtOMP85 verglichen werden. Wie man anhand der Abbildung 3-8A erkennen kann, konnte mit Hilfe eines Hydropathie-Plots ebenfalls ein hydrophiler Bereich im N-Terminus von TgOMP85, zwischen der 80. und 95. Aminosäure (gekennzeichnet durch einen Pfeil), identifiziert werden. Vergleicht man die Position des hydrophilen Bereichs in TgOMP85 (A) mit der von PtOMP85 (B), welche zwischen der 70. und 83. Aminosäure vorzufinden ist (ebenfalls mit einem Pfeil gekennzeichnet), so wird deutlich, dass beide in einem ähnlichen Bereich des N-Terminus der Proteine anzutreffen sind.

Um den möglichen Einfluss des identifizierten, hydrophilen Bereichs auf die Lokalisation von TgOMP85 analysieren zu können, wurden mit zwei unterschiedlich langen Proteinen Lokalisationsstudien mittels IFA in *T. gondii* durchgeführt. Das erste beinhaltete dabei die ersten 78 Aminosäuren von TgOMP85 (TgOMP85<sup>78-Ty</sup>), wohingegen das zweite aus den ersten 95 Aminosäuren (TgOMP85<sup>95-Ty</sup>) bestand. Der Grund, weshalb die Lokalisation von TgOMP85<sup>95-Ty</sup> ebenfalls untersucht werden sollte, war, sicher zu stellen, dass man die in PtOMP85 zwischen dem Ende des SP und dem Beginn des hydrophilen Bereichs vorliegende Distanz von ca. 45 Aminosäuren auch bei der Analyse des N-Terminus von TgOMP85 einhält.

A

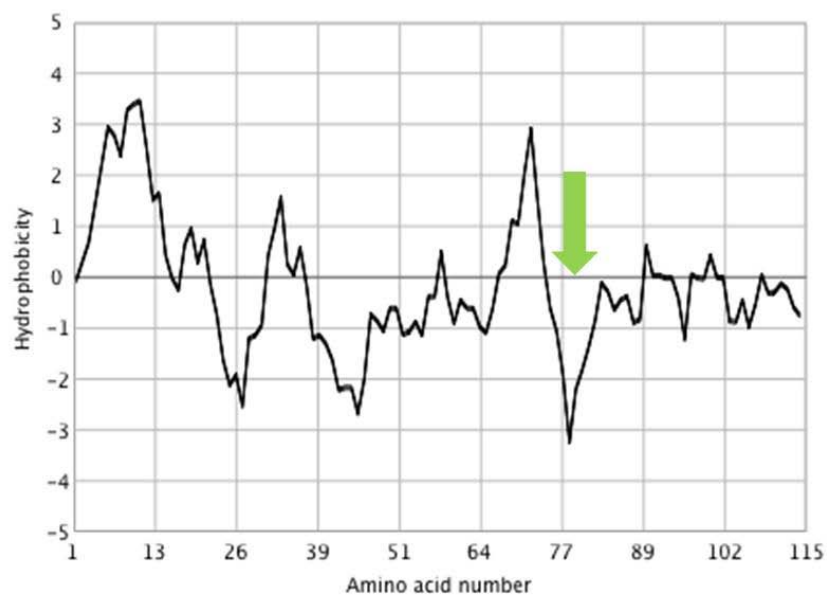
### TgOMP85



SP

B

### PtOMP85



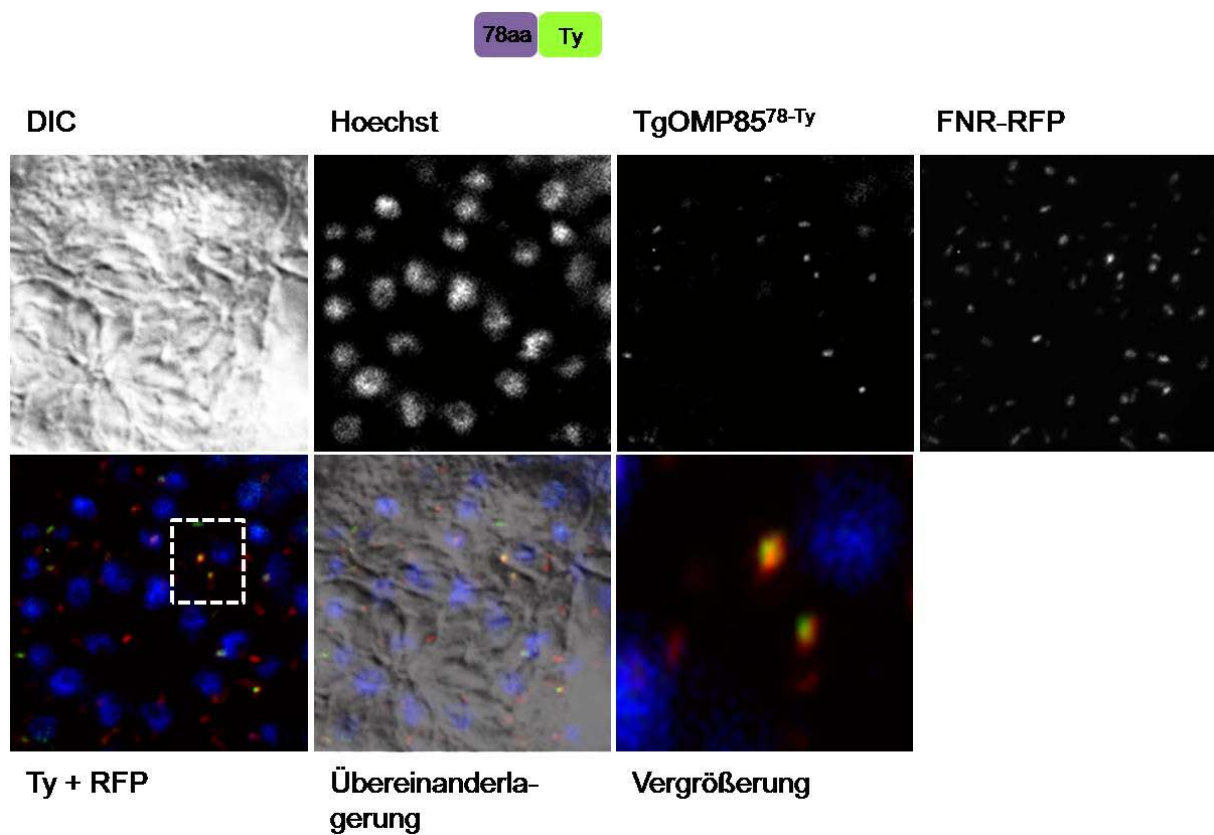
SP

TP

**Abbildung 3-8: Vergleich der Hydropathie-Plots von TgOMP85 und PtOMP85**

Durch die Erstellung eines Hydropathie-Plots konnte im N-Terminus von TgOMP85 (A) ebenfalls ein hydrophiler Bereich identifiziert werden. Ein Vergleich der Hydropathie-Plots von TgOMP85 und PtOMP85 (B) deutet auf eine ähnliche Position des hydrophilen Bereichs im N-Terminus hin.

Für die Lokalisationsstudien wurden die für die beiden Bereiche (1-78aa bzw. 1-95aa) kodierenden Sequenzen über die *EcoRI*- und *NsiI*-Schnittstelle in den TUB8mycGFPMyoATy-HX\_117 (V117) Vektor kloniert, transient in *T. gondii* transfiziert, und die daraus resultierenden und ex primerten Ty-Tag Fusionsproteine mit Hilfe des Immunfluoreszenzmikroskops auf ihre Lokalisation hin analysiert. Um eine Aussage über deren mögliche Lokalisation im Apikoplasten treffen zu können, wurde zu dem eine Kolokalisation mit FNR-RFP durchgeführt.



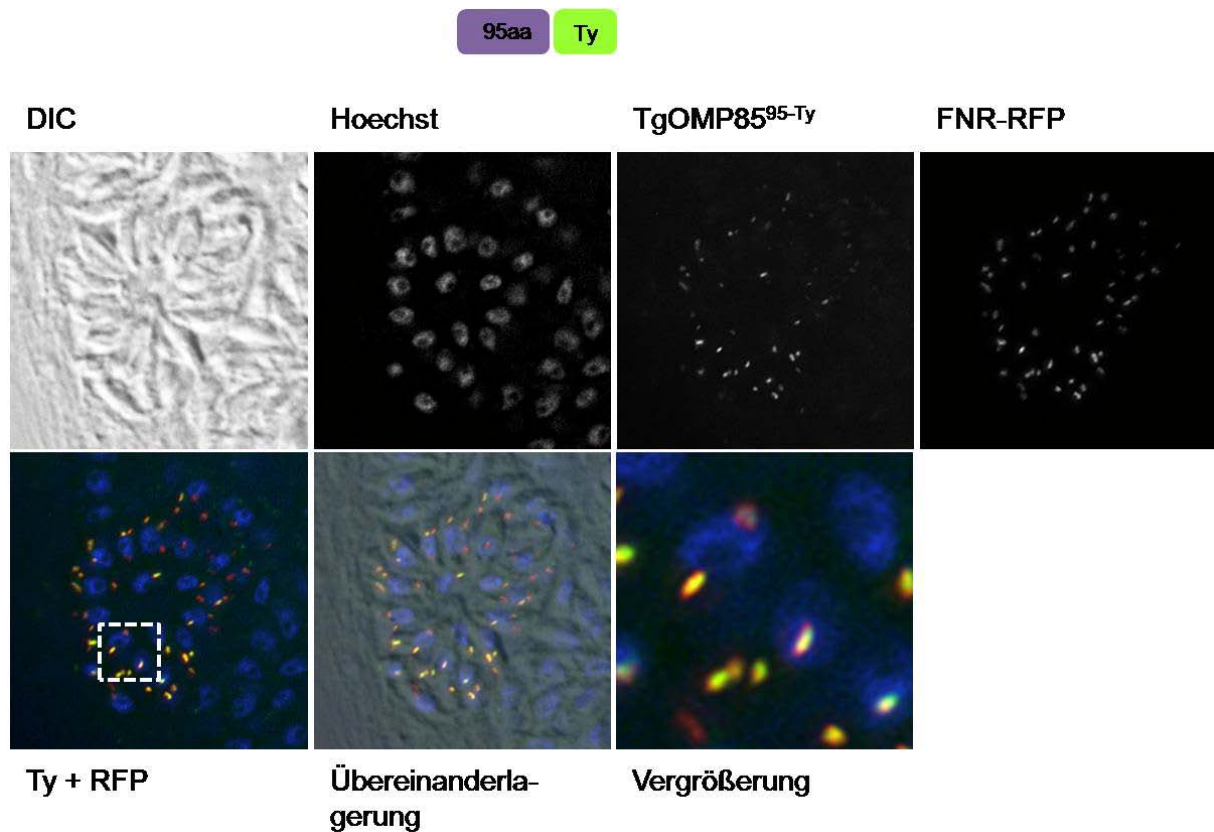
**Abbildung 3-9: TgOMP85<sup>78-Ty</sup> kolokalisiert mit FNR-RFP im Apikoplasten**

Um den Einfluss eines möglichen hydrophilen Bereichs im N-terminalen Anteil von TgOMP85 auf seine Lokalisation bzw. seinen Transport in den Apikoplasten untersuchen zu können, wurde das Fusionsprotein TgOMP85<sup>78-Ty</sup>, bestehend aus den ersten 78 aa und dem Ty-Tag, nach Erstellen eines Hydropathie-Plots auf seine Lokalisation im Parasiten durch eine IFA untersucht. Wie man anhand des Überlappens der Signale mit denen von FNR-RFP sehen kann, ist das 78 aa lange Fragment in der sekundären Plastide lokalisiert.

Betrachtet man die Ergebnisse der Lokalisationsanalysen des TgOMP85<sup>78-Ty</sup> Proteins (Abbildung 3-9), so ist zu erkennen, dass das 78 Aminosäuren lange TgOMP85 Fragment mit dem Markerprotein FNR-RFP im Apikoplasten kolokalisiert. Eine Deutungsmöglichkeit dieses Befundes ist, dass der N-terminale Abschnitt mit dem enthaltenen hydrophilen



Bereich, die Lokalisation des Proteins bestimmt. Wie sich anhand der IFA mit dem FNR-RFP erkennen lässt, weist das um 17 Aminosäuren längere Fragment, TgOMP85<sup>95-Ty</sup>, ebenfalls eine Lokalisation innerhalb der Plastide von *T. gondii* auf (Abbildung 3-10).



**Abbildung 3-10: Kolokalisierung von TgOMP85<sup>95-Ty</sup> mit FNR-RFP im Apikoplasten**

Wie bei TgOMP85<sup>78-Ty</sup> wurde ebenfalls eine Kolokalisation von TgOMP85<sup>95-Ty</sup> mit dem Apikoplastenmarkerprotein durchgeführt. Zur Visualisierung der Zellkerne wurden diese mit Höchst angefärbt.

Schlussfolgernd lässt sich somit feststellen, dass mit Hilfe eines Hydropathie-Plots ebenfalls ein hydrophiler Bereich im N-Terminus von TgOMP85 identifiziert werden konnte. Gemeinsam mit dem SP könnte es eine funktionelle BTS-Sequenz für TgOMP85 darstellen und für den Transport bzw. Lokalisation des Proteins verantwortlich sein.

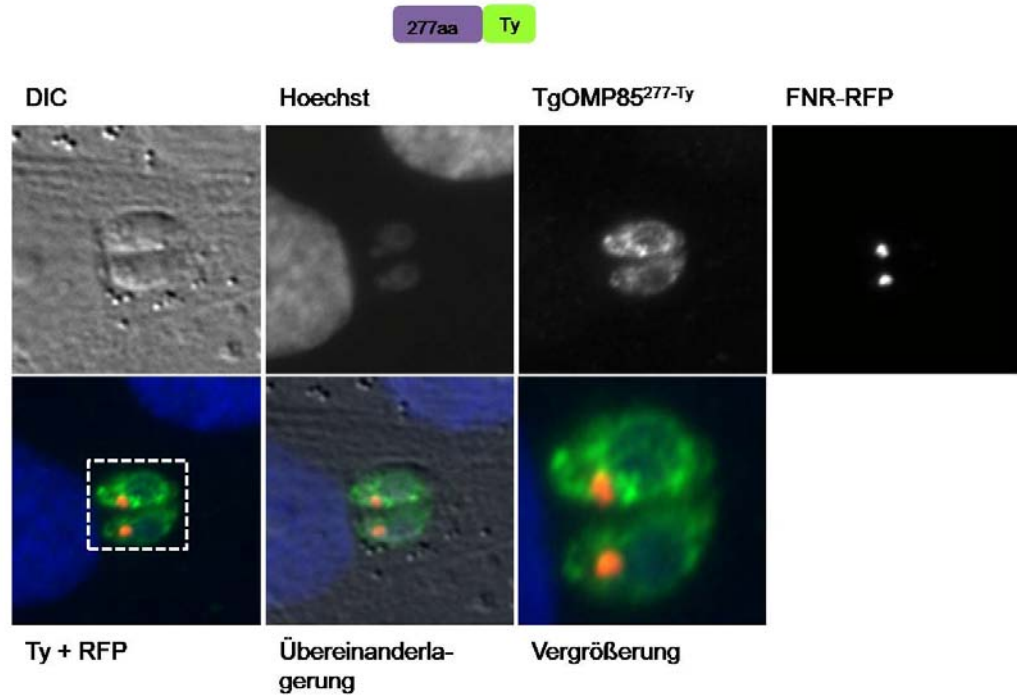


### 3.6 Lokalisationsstudien weiterer TgOMP85-Fragmente

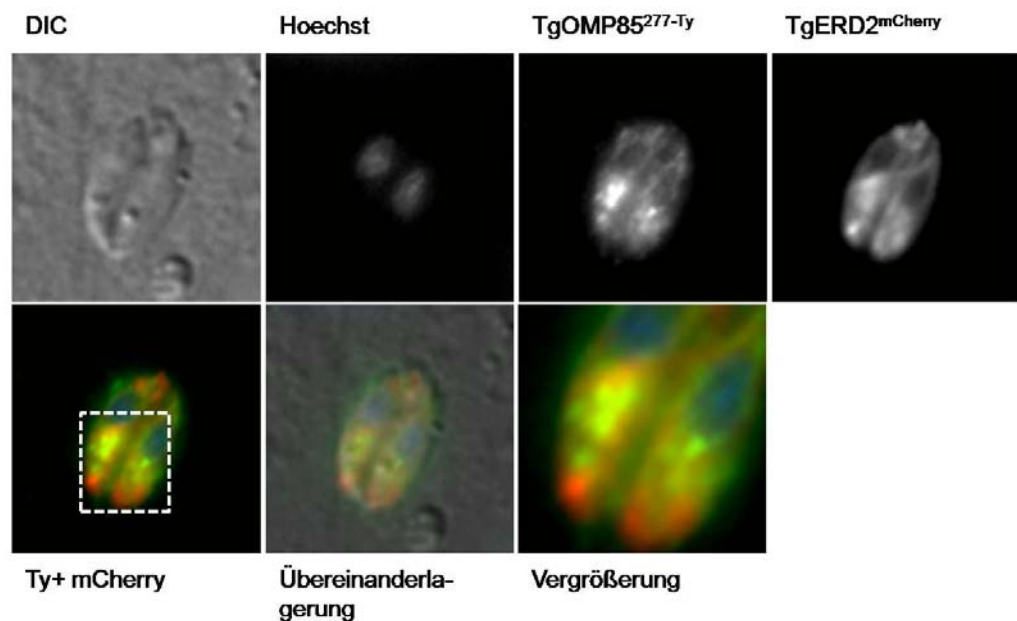
Die Identifizierung eines SP und einer hydrophilen Region im N-Terminus von TgOMP85 und die dazu gehörenden Lokalisationsstudien zeigten, dass in den ersten 100 Aminosäuren des Proteins eine funktionelle BTS-Sequenz enthalten ist. Ausgehend von diesem Ergebnis sollte in einem weiteren Versuch der Transportweg von TgOMP85 näher analysiert werden, um zu überprüfen, wie das vollständige Protein nun letztendlich zum Apikoplasten gelangt. Dazu wurden weitere Ty-markierte TgOMP85-Fragmente mit Hilfe von IFA auf ihre Lokalisation im Parasiten hin überprüft. Das erste Fragment enthielt die ersten 277 Aminosäuren von TgOMP85 (TgOMP85<sup>277-Ty</sup>), wohin gegen die anderen beiden Fragmente die ersten 512 (TgOMP85<sup>512-Ty</sup>) bzw. die ersten 790 Aminosäuren (TgOMP85<sup>790-Ty</sup>) von TgOMP85 umfassten. Die kodierenden Sequenzen dieser Proteine wurden über die *EcoRI*- und *NsiI*-Restriktionsstellen in den TUB8mycGFPMyoATy-HX\_117 (V117) Vektor kloniert, die Plasmide in *T. gondii* transfiziert und bezüglich ihrer Lokalisation im Parasiten analysiert. Letzteres erfolgte, wie zuvor bei der Analyse der verkürzten TgOMP85-Fragmente, über einen C-terminalen Ty-Tag. Da sowohl TgOMP85<sup>78-Ty</sup> und TgOMP85<sup>95-Ty</sup>, als auch TgOMP85<sup>Ty</sup> eine Lokalisation im Apikoplasten aufwiesen, war zu erwarten, dass dies auch für TgOMP85<sup>277-Ty</sup>, TgOMP85<sup>512-Ty</sup> und TgOMP85<sup>790-Ty</sup> gilt. Daher wurden mit letzteren ebenfalls Kolokalisationen mit FNR-RFP durchgeführt.

Vergleicht man das Signal des TgOMP85<sup>277-Ty</sup> Proteins mit dem von FNR, so wird deutlich, dass beide keinerlei Ähnlichkeiten bezüglich der Verteilung und subzellulären Lokalisation aufweisen (Abbildung 3-11A). Während man für das FNR-Protein, wie zuvor beobachtet, ein punktuell Signal in der sekundären Plastide des Parasiten erhält, scheint sich das Signal von TgOMP85<sup>277-Ty</sup> eher über weite Teile des Tachyzoiten zu erstrecken. Um die exakte Position des TgOMP85<sup>277-Ty</sup> Proteins im Parasiten definieren zu können, wurde eine weitere mikroskopische Analyse durchgeführt. Diese bestand darin, das zu analysierende Protein mit einem anderen, Organellen-spezifischen Markerprotein zu kolokalisieren. Nach einem Vergleich des Signals für das TgOMP85<sup>277-Ty</sup> Protein mit dem von Pfluger und Kollegen publizierten Signal für den HDEL-Rezeptor TgERD2 („Endoplasmic Reticulum Retention Receptor 2“), dessen Signal sich ebenfalls über den gesamten Parasiten erstreckt (Abbildung 3-11B) und eine Lokalisation im Golgi bzw. Endoplasmatischen Retikulum des Parasiten zeigt (Pfluger *et al.*, 2005), wurde ersichtlich, dass das hier untersuchte Protein ebenfalls in den bei den genannten Organellen vorzufinden ist (Abbildung 3-11B). Aus diesem Grund wurde die kodierende Sequenz für das TgERD2 Protein über die *EcoRI*- und *NsiI*-Restriktionsstellen in den TUB8mycGFPMyoATy-HX\_117 (V117) Vektor kloniert und zusammen mit dem TgOMP85<sup>277-Ty</sup> Plasmid transient kotransfiziert.

A



B



**Abbildung 3-11: Lokalisation von TgOMP85<sup>277-Ty</sup> im ER bzw. Golgi von *T. gondii***

Zur Verifizierung der Lokalisation von TgOMP85<sup>277-Ty</sup> wurden Kolo-kalisationen mit FNR-FRP (A) und dem ER bzw. Golgimarker TgERD2, welches an mCherry fusioniert wurde [TgERD2<sup>mCherry</sup> (B)], durchgeführt. Zur Visualisierung der Zellkerne wurden diese mit Hoechst angefärbt.

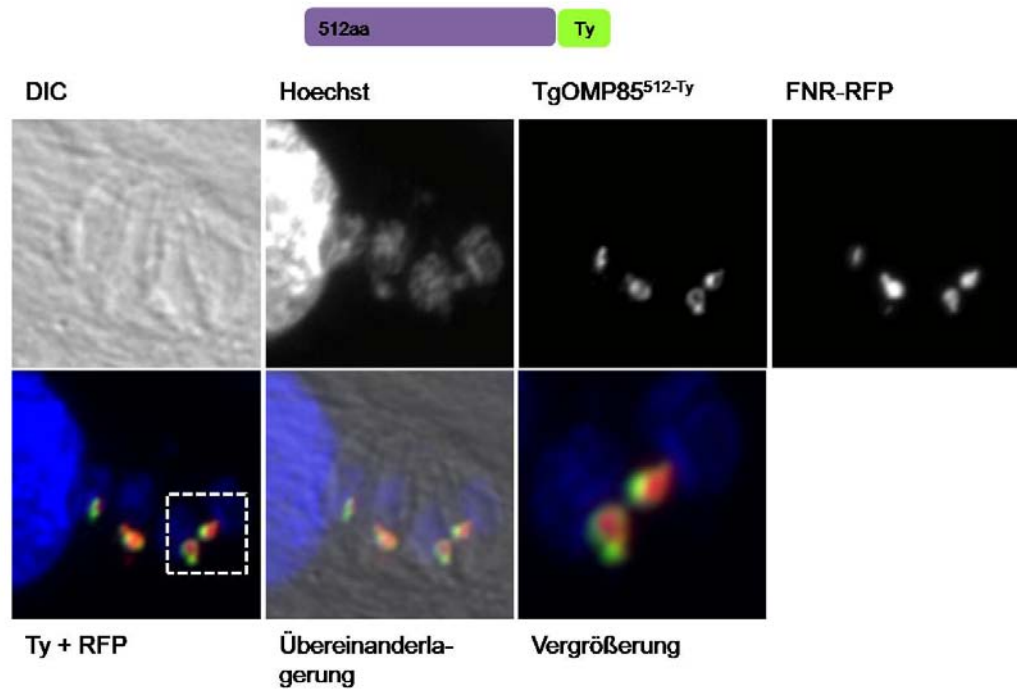
Die Analyse der Transfektanten erfolgte durch IFA. Zur Visualisierung des Golgi- bzw. ER-Markers wurde dieser am C-Terminus mit mCherry, einem mit GFP verwandten, rot fluoreszierendem Protein, fusioniert. Das Ergebnis dieser Studie ergab, wie in Abbildung 3-11B dargestellt, eine partielle Kolokalisation des grün dargestellten TgOMP85<sup>277-Ty</sup> Proteins mit dem Golgi- bzw. ER-Marker, TgERD2.

Somit konnte die Lokalisation dieses TgOMP85-Fragments zu einem gewissen Grad dem Golgi zugeordnet werden. Weshalb dieses Fragment jedoch im Vergleich zu den TgOMP85<sup>78-Ty</sup> und TgOMP85<sup>95-Ty</sup> Proteinen keine Lokalisation im Apikolasten von *T. gondii* aufweist, lässt sich zunächst nicht aufklären.

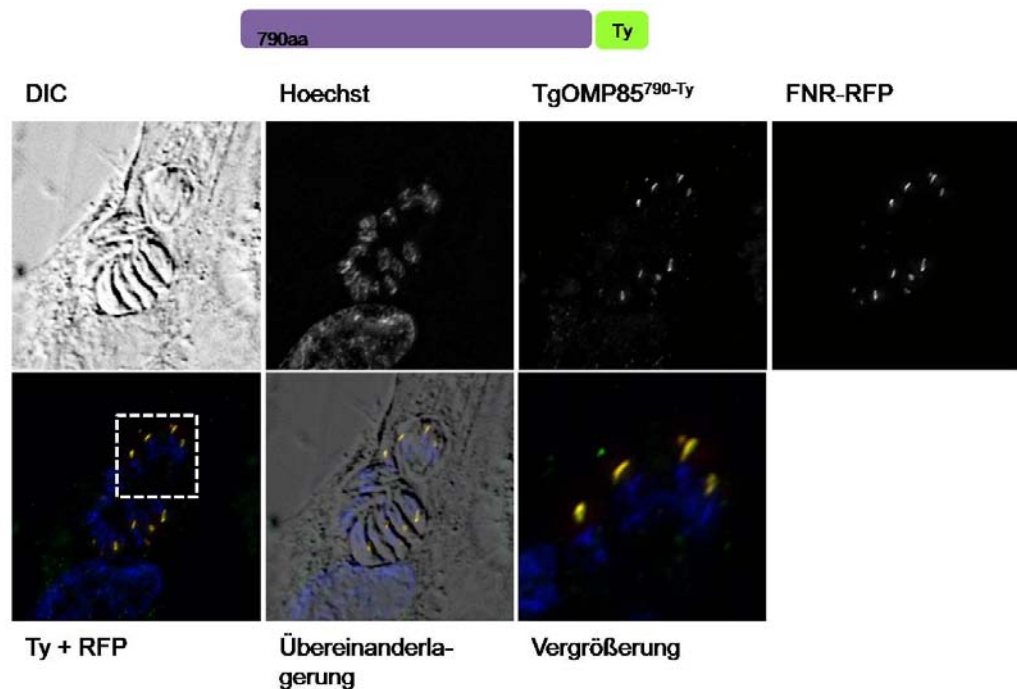
Wie eingangs erwähnt, sollten ebenfalls die Lokalisationen von TgOMP85<sup>512-Ty</sup> und TgOMP85<sup>790-Ty</sup> näher untersucht werden. Betrachtet man zunächst das Ergebnis der Lokalisationsuntersuchung für TgOMP85<sup>512-Ty</sup> und vergleicht dessen Signal mit dem des FNR, so ist zu erkennen, dass dieses Protein im Vergleich zu dem kürzeren TgOMP85<sup>277-Ty</sup> eine eindeutige, plastidäre Lokalisation aufweist. Jedoch wird bei genauer Betrachtung des TgOMP85<sup>512-Ty</sup> Signals deutlich, dass dieses weniger punktuell erscheint als das des FNR und das Signal des Stromamarkers großteils umgibt (Abbildung 3-12A, Ty + RFP und Übereinanderlagerung). Auch für das zweite Protein, TgOMP85<sup>790-Ty</sup>, lässt sich eine klare Lokalisation im Apikoplasten erkennen (Abbildung 3-12B). Ob hier ebenfalls ein peripheres, das Stroma umgebendes Signal vorliegt, lässt sich anhand der vorliegenden Daten nicht eindeutig feststellen.

Die in Abbildung 3-12 dargestellten Ergebnisse demonstrieren, dass das Anfügen von weiteren 235 beziehungsweise 513 Aminosäuren an TgOMP85<sup>277-Ty</sup> zu einer Wiederherstellung der Lokalisation des Proteins in der sekundären Plastide führt. Des Weiteren wird bei genauer Betrachtung der in Abbildung 3-12A abgebildeten Lokalisationsstudie deutlich, dass das TgOMP85<sup>512-Ty</sup> Signal das Signal des stromalen Markers umgibt. Dies könnte auf eine Lokalisation von TgOMP85<sup>512-Ty</sup> in den äußeren Apikoplastenmembranen hinweisen.

A



B



**Abbildung 3-12: Lokalisation von TgOMP85<sup>512-Ty</sup> und TgOMP85<sup>790-Ty</sup> im Apikoplasten von *T. gondii***

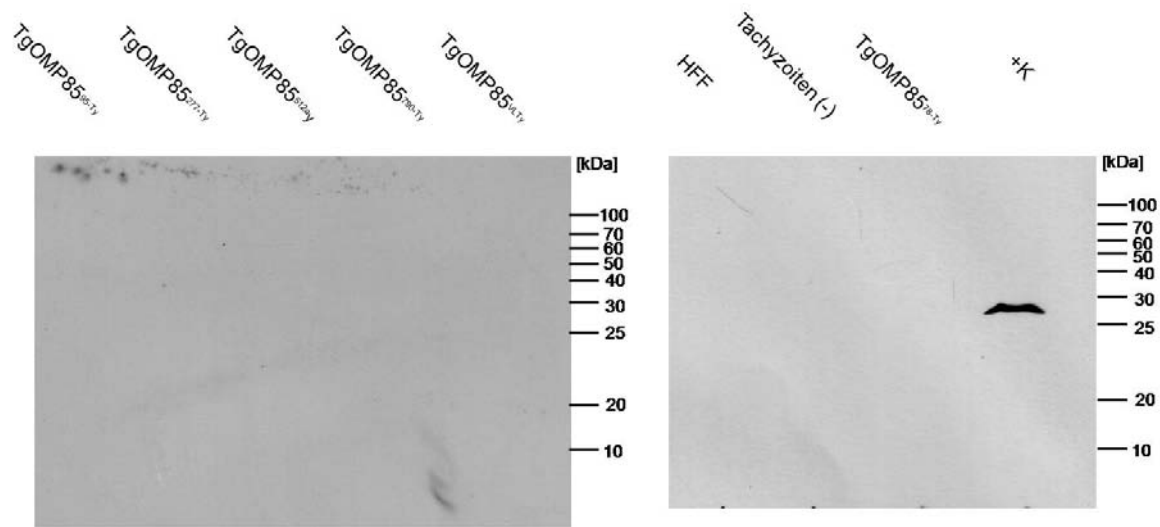
Eine Kolokalisation von TgOMP85<sup>512-Ty</sup> und TgOMP85<sup>790-Ty</sup> mit FNR zeigt eine Lokalisation beider TgOMP85-Fragmente im Apikoplasten des Parasiten. Zur Visualisierung der Zellkerne wurde eine Hoechstfärbung durchgeführt.

#### **3.7 Biochemische Analysen und Nachweis einer Prozessierung des Proteins TgOMP85**

Nach den Lokalisationsstudien für TgOMP85 und die generierten, verkürzten Versionen dieses Proteins (siehe Abschnitt 3.4 - 3.6) galt es, diese Proteine durch biochemische Verfahren in Western-Blots nachzuweisen und im Anschluss zu analysieren. Da Apikoplastenproteine während des Importvorganges eine Prozessierung in Form einer Abspaltung des Signalpeptids im ER und der Abspaltung des Transitpeptids in der Plastide erfahren (Waller *et al.*, 2000), sollte durch die folgenden Untersuchungen die Frage nach einer solchen Prozessierung für TgOMP85 bearbeitet werden. Zudem sollte weiterhin versucht werden, eine mögliche Assoziation dieser Proteine mit den Apikoplastenmembranen zu charakterisieren. Für die biochemischen Untersuchungen wurden zunächst alle in den Abschnitten 3.4 bis 3.6 aufgeführten Konstrukte in Tachyzoiten transient transfiziert. Diese Transfektanten wurden darauffolgend nach 24-48 Stunden lysiert und die so gewonnenen Totallysate biochemischen Analysen in Form einer SDS-PAGE und eines Western-Blots, unterzogen.

In Abbildung 3-13 sind die Ergebnisse dieser Experimente dargestellt. Betrachtet man zunächst den Blot auf der linken Seite, so wird deutlich, dass weder in den Proben der transient mit den TgOMP85-Fragmenten transfizierten Tachyzoiten, noch in jenen, die mit dem Protein voller Länge transfiziert worden waren, Ty-markierte Proteine detektiert werden konnten. Um die Funktionalität und Spezifität des verwendeten Primärantikörpers (Maus-anti Ty Antikörper) zu überprüfen, wurde als Positivkontrolle (+K) gleichzeitig das Totallysat von Tachyzoiten untersucht, welche das Gen für TgOMP85<sup>277-Ty</sup> in ihr Genom integriert haben und das Protein stabil exprimieren. Diese TgOMP85<sup>277-Ty</sup> stabil exprimierenden Parasiten, die bei diesen Experimenten als Positivkontrolle verwendet wurden, wurden freundlicherweise von Dr. Markus Meissner hergestellt.

Als Negativkontrolle (-K) wurden Totallysate von HFF beziehungsweise nicht transfizierter Tachyzoiten [Tachyzoiten (-)] verwendet. Der verwendete Maus-anti Ty Antikörper sollte in der Positivkontrolle eine Bande mit einer ungefähren Masse von 30 kDa detektieren, wohingegen in den genannten Negativkontrollen keine Reaktion stattfinden sollte.



**Abbildung 3-13: Western-Blot des Totallysats transient transfizierter Tachyzoiten zum Nachweis von TgOMP85, den TgOMP85-Fragmenten und möglichen Prozessierungsprodukte**

Die mit verschiedenen TgOMP85-Konstrukten transient transfizierten Tachyzoiten wurden 24-48h nach der Transfektion lysiert und die daraus gewonnenen Totallysate für die Analysen mittels SDS-PAGE (15%-iges Gel) und Western-Blot verwendet. Pro Spur wurden 10\*8 Zelläquivalente geladen. Als Primärantikörper wurde der Maus-anti Ty und als Sekundärantikörper der Ziege-anti Maus HRP Antikörper verwendet.

Betrachtet man die in Abbildung 3-13 dargestellten Ergebnisse, so ist eindeutig zu erkennen, dass keine Ty-markierten Proteine in den Totallysaten der transient transfizierten Tachyzoiten detektierbar waren. Da sich in der Positivkontrolle (TgOMP85<sup>277-Ty</sup>, stabil transfiziert, +K) eine Bande mit der erwarteten Masse von ca. 30 kDa detektieren ließ, konnte die Funktionalität und Spezifität des Maus-anti Ty Antikörpers nachgewiesen werden. Eine Kreuzreaktion des Primärantikörpers mit anderen Proteinen ist auszuschließen, da in den Negativkontrollen (HFF beziehungsweise nicht transfizierten Tachyzoiten) keine Banden detektiert wurden. Eine mögliche Ursache für die Abwesenheit der Proteine in den anderen Spuren könnte in einer zu niedrigen Expression in den Transfektanten liegen. Daher wurde der Versuch unternommen, stabile Parasitenlinien mit Hilfe der sogenannten „Restriction Enzyme Mediated Integration“ (REMI, Black *et al.*, 1995) zu generieren. Diese Parasiten sollten die genannten Proteine stabil und in ausreichenden Mengen exprimieren. Totallysate solcher Linien sollten folgerichtig eine höhere Konzentration der benötigten Proteine aufweisen.

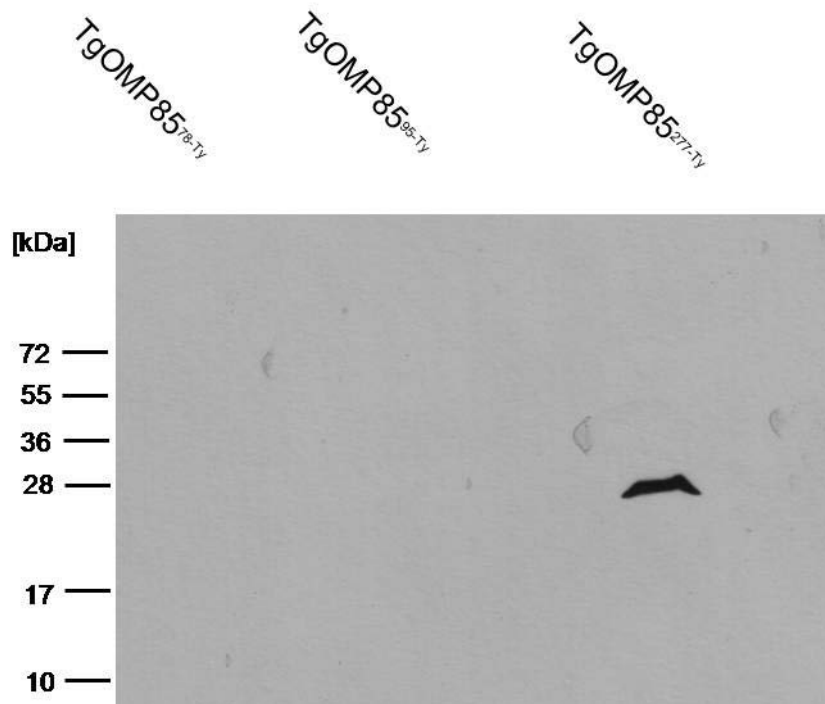
Trotz mehrerer Versuche gelang es jedoch nicht, stabile Klone zu erhalten. Tabelle 3 zeigt die Anzahl der Versuche, stabile Parasitenlinien zu generieren und die dabei verwendete DNA-Menge.

	DNA-Menge: 50µg	DNA-Menge: 100µg
TgOMP85 <sup>78-Ty</sup>	5x	5x
TgOMP85 <sup>95-Ty</sup>	5x	5x
TgOMP85 <sup>277-Ty</sup>	2x	2x
TgOMP85 <sup>512-Ty</sup>	5x	5x
TgOMP85 <sup>790-Ty</sup>	5x	5x
TgOMP85 <sup>Ty</sup>	5x	5x
TgOMP85 <sup>HA</sup>	3x	3x

**Tabelle 3: Anzahl der Versuche, stabile Parasitenlinien zu generieren und die dabei verwendete DNA-Menge**

Mit Hilfe der REMI sollten stabile Parasitenlinien generiert werden. Die Anzahl der Versuchsanläufe für die TgOMP85-Fragmente und für das volle Länge Protein betrug im Durchschnitt um die fünf Male, wobei verschiedene DNA-Mengen eingesetzt wurden.

Nach einer positiven Selektion konnten nur jene Parasiten kultiviert werden, die mit den für TgOMP85<sup>78-Ty</sup> und TgOMP85<sup>95-Ty</sup> kodierenden Plasmiden transfiziert wurden. Nach einer Selektionszeit von ca. 10-14 Tagen wurden aus diesen Parasiten Proben hergestellt und proteinbiochemisch analysiert. Anhand des Ergebnisses in Abbildung 3-14 wird deutlich, dass die Parasiten, welche mit den für TgOMP85<sup>78-Ty</sup> und TgOMP85<sup>95-Ty</sup> kodierenden Plasmiden transfiziert wurden, trotz positiver Selektion die entsprechenden Proteine nicht stabil exprimierten, weshalb diese TgOMP85 Fragmente nicht im Western-Blot detektierbar waren. Der Grund dafür könnte sein, dass die zufällige Integration dieser Konstrukte in Bereichen des Parasitengenoms erfolgte, welche nur eine geringe Expression aufweisen. In diesem Fall waren die Konzentrationen beider Proteine nicht ausreichend, um diese im Western-Blot detektieren zu können. Um zu zeigen, dass dieses negative Ergebnis nicht auf dem verwendeten Primärantikörper beruht, wurde die Funktionalität des Maus-anti Ty Antikörpers anhand der Positivkontrolle TgOMP85<sup>277-Ty</sup> demonstriert, welche bereits in dem unter Abbildung 3-13 abgebildeten Experiment eingesetzt wurde.



**Abbildung 3-14: Proteinbiochemischer Nachweis von TgOMP85<sup>78-Ty</sup> und TgOMP85<sup>95-Ty</sup>**

Um die TgOMP85 Fragmente nachweisen zu können, wurde versucht, stabile Transfektantenlinien zu generieren. Nach positiver Selektion lagen nur solche Parasiten vor, die mit den Plasmiden für TgOMP85<sup>78-Ty</sup> bzw. <sup>95-Ty</sup> transfiziert wurden. Als Positivkontrolle fungierte die TgOMP85<sup>277-Ty</sup> stabil und in ausreichenden Mengen exprimierende Parasitenlinie, welche von Dr. Markus Meissner hergestellt wurde. Als Primärantikörper wurde der Maus-anti Ty und als Sekundärantikörper der Ziege-anti Maus HRP Antikörper verwendet.

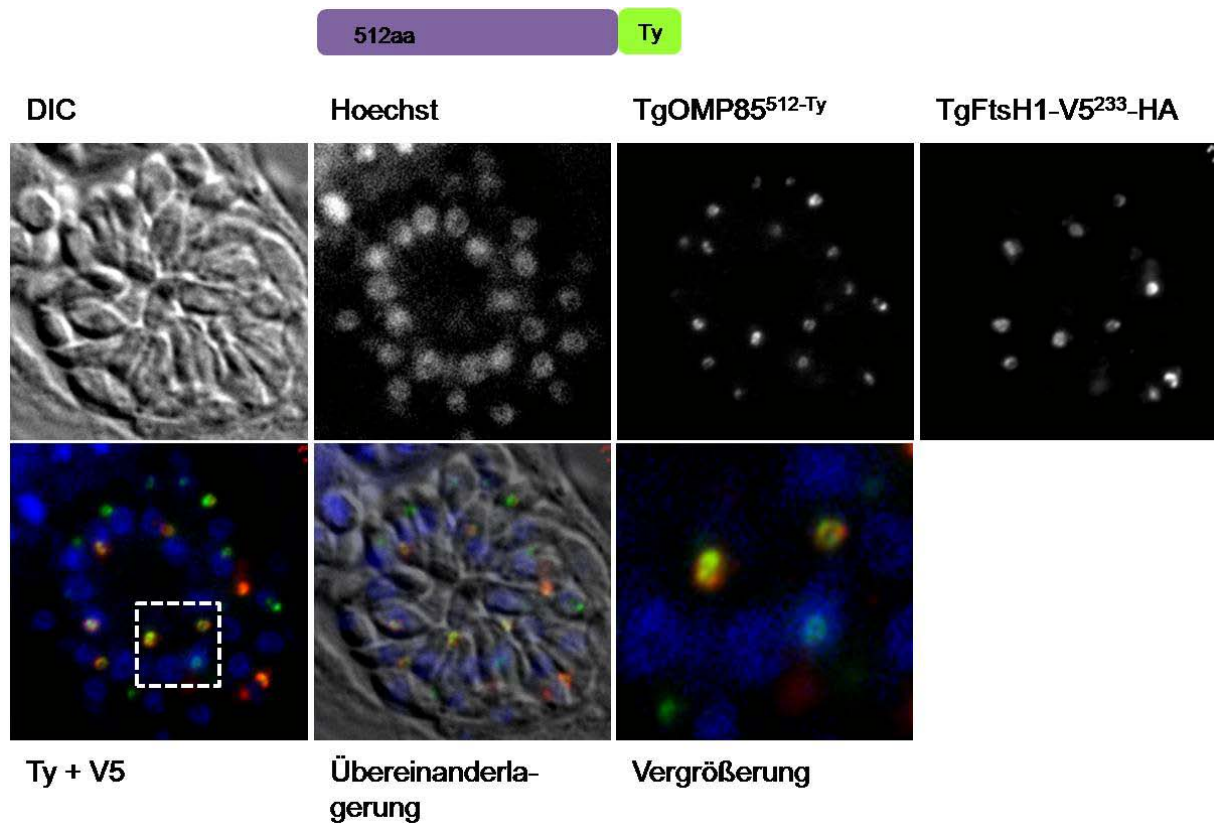
Aufgrund der Tatsache, dass weder für das vollständige TgOMP85 noch für die einzelnen TgOMP85-Fragmente stabile Transfektanten generiert werden konnten, war es nicht möglich, weitere Untersuchungen durchzuführen, die eine Aussage über eine mögliche Prozessierung oder eine Membranassoziation mit den Membranen des Apikoplasten erlauben. Da jedoch für die stabile TgOMP85<sup>277-Ty</sup> Parasitenlinie in beiden Western-Blots jeweils nur eine einzelne Bande detektiert werden konnte, scheint eine Prozessierung dieses Proteins unwahrscheinlich. Berücksichtigt man zusätzlich die aus den IFA erhaltenen Ergebnisse der Lokalisationsstudien für dieses Protein, so ist eine im Apikoplasten statt findende Prozessierung auch aufgrund der beobachteten Lokalisation dieses Proteins im ER bzw. Golgi auszuschließen.



#### **3.8 Analyse der Lokalisation von TgOMP85<sup>512-Ty</sup> in Membranen des Apikoplasten**

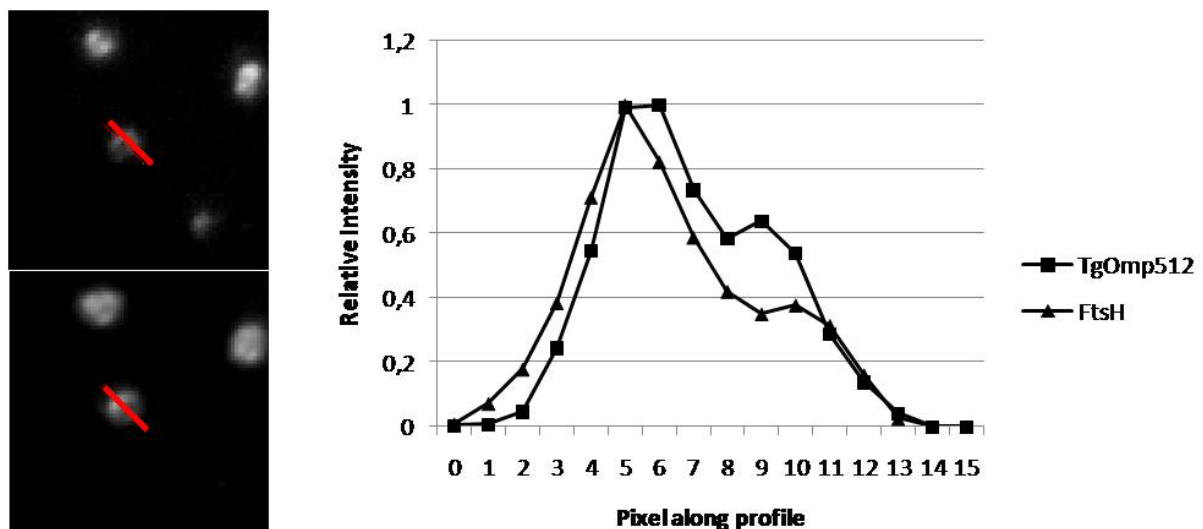
Betrachtet man das in Abbildung 3-12A dargelegte Ergebnis der Lokalisationsstudien von TgOMP85<sup>512-Ty</sup>, so impliziert dieses eine Lokalisation des Proteins in den äußeren Membranen des Apikoplasten. Um die intraorganelle Lokalisation dieses TgOMP85-Fragments verifizieren zu können, wurden weitere IFA durchgeführt. Hierzu wurden zwei verschiedene Plasmide transient in Tachyzoiten transfiziert und die entsprechenden Proteine anschließend im Parasiten lokalisiert. Bei dem ersten der beiden transfizierten Plasmide handelte es sich um jenes für das TgOMP85<sup>512-Ty</sup> Protein, während das zweite Plasmid für eine Metalloprotease kodierte (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Marilyn Parsons). Bei letzterer handelte es sich um die Zink-abhängige Protease TgFtsH1, ein Protein mit einer Länge von 1250 aa und einer Transmembrandomäne (Karnataki *et al.*, 2009). Aufgrund seiner Lokalisation in den äußeren Apikoplastenmembranen konnte dieses Protein als Marker für die intraorganelle Lokalisationsstudie verwendet werden.

Zur Visualisierung bzw. Detektion wurde das TgFtsH1 Protein mit einem HA-Tag versehen. Zusätzlich wies es an der Position der 233. Aminosäure eine weitere, V5-Tag genannte Markierung auf (TgFtsH1-V5<sup>233</sup>-HA), die sich von einem kleinen Epitop der V- und P-Proteine des Simian Virus 5 (SV5-Virus) ableiten lässt. Wie man anhand des Ergebnisses in Abbildung 3-15 erkennen kann, scheint das rote Signal des TgFtsH1-V5<sup>233</sup>-HA das grüne Signal des TgOMP85<sup>512-Ty</sup> zu umgeben, in anderen Fällen findet man jedoch den umgekehrten Fall vor, dennoch scheinen die beiden Proteine wie erwartet im Apikoplast lokalisiert zu sein, was anhand der Überlagerung beider Signale ersichtlich wird. Diese Kolo-kalisation beider Proteine ließ sich durch ein sogenanntes Pixelprofil, in dem die Intensität und die Verteilung der Signale beider Proteine miteinander verglichen wurden, bestätigen (Abbildung 3-16).



**Abbildung 3-15: Intraorganelle Lokalisation von TgOMP85<sup>512-Ty</sup>**

Das in Abbildung 3-12A dargebrachte Ergebnis implizierte bereits eine Lokalisation von TgOMP<sup>512-Ty</sup> in den äußeren Apikoplastenmembranen. Um dies zu überprüfen, wurde eine Kolo-kalisation mit dem Protein TgFtsH1-V5<sup>233</sup>-HA (rotes Signal) durchgeführt, welches in den äußeren Membranen des Apikoplasten vorzufinden ist.



**Abbildung 3-16: Nachweis der Kolo-kalisation von TgOMP<sup>512-Ty</sup> mit TgFtsH1-V5<sup>233</sup>-HA**

Durch das Erstellen eines Pixelprofils, in dem die Intensität und Verteilung der Signale beider Proteine miteinander verglichen wurden, ließ sich die Kolo-kalisation von TgOMP85<sup>512-Ty</sup> mit TgFtsH1-V5<sup>233</sup>-HA verifizieren

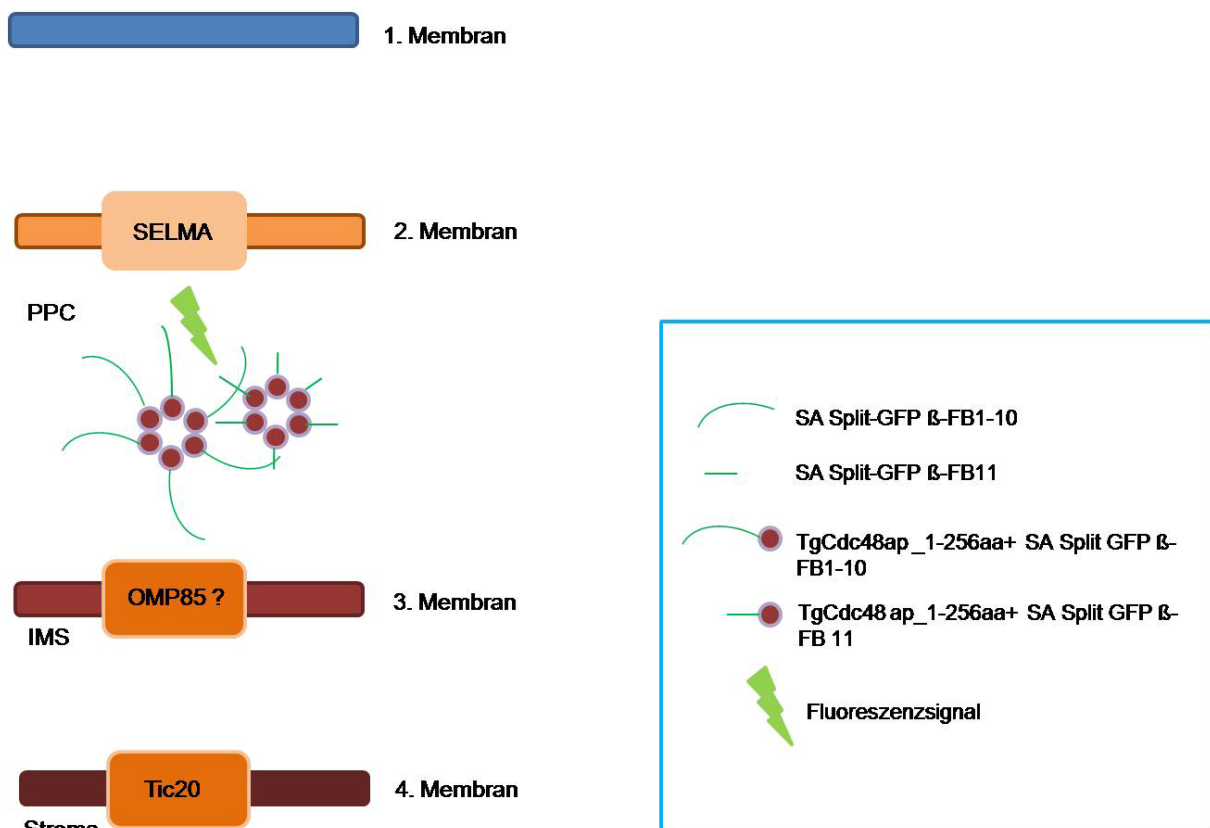
Aus diesen Ergebnissen kann daher geschlossen werden, dass TgOMP85<sup>512-Ty</sup> in der Tat, wie das TgFtsH1 in den äußeren Apikoplastenmembranen vorzufinden ist.

Alternativ zu TgFtsH1-V5<sup>233</sup>-HA sollte eine weitere Untersuchung mit dem „Apikoplast Phosphat Translokator 1“ (TgAPT) als einen weiteren Marker durchgeführt werden. Dieser wurde in der Literatur (Karnataki *et al.*, 2007, 2009) ebenfalls als Protein der Apikoplastenmembran beschrieben und gehört der „Plastidic Phosphate Translocator“ Familie an (Karnataki *et al.*, 2007), die eine wichtige Funktion beim Austausch von phosphorylierten C3 -, C5 - und C6 - Zuckern spielen (Tetlow *et al.*, 1996). Jedoch blieb hierbei bereits die transiente Transfektion des Plasmids (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. M. Parsons), möglicherweise aufgrund der geringen Effizienz während den Kotransfektionen, ohne Erfolg.

#### **3.9 Einsatz des Self-Assembling Split GFP Systems zur Bestimmung der Topologie von TgOMP85 in einer der vier Membranen des Apikoplasten von *T. gondii***

Trotz eindeutiger Lokalisation von TgOMP85 im Apikoplasten und der Zuhilfenahme bekannter Markerproteine war es nicht möglich, TgOMP85 durch Kollokalisationsstudien eindeutig einer der vier Membranen des Apikoplasten zuzuordnen. Eine Alternative zu diesem Ansatz bietet das sogenannte „Self-Assembling Split GFP System“. Das grün fluoreszierende Protein (GFP), das sich aus insgesamt 11  $\beta$ -Faltblättern zusammensetzt, ist hierbei eine standardmäßig zur Detektion eingesetzte Proteinmarkierung. Die Grundidee des Self-Assembling Split GFP Systems besteht darin, das GFP in zwei unterschiedlich große Fragmente zu teilen, und diese jeweils an gewünschte Proteine zu fusionieren. Hierbei besteht das erste Fragment aus den ersten 10  $\beta$ -Faltblättern, während das zweite Fragment das 11.  $\beta$ -Faltblatt repräsentiert (Cabantous und Waldo, 2006). Die beiden Fragmente sind für sich genommen nicht in der Lage zu fluoreszieren, kommen sie jedoch in dem gleichen Kompartiment vor, so entwickeln sie die für GFP typische grüne Fluoreszenz. Das Self-Assembling Split GFP System sollte in der vorliegenden Arbeit zur Zuordnung von TgOMP85 zu einer der vier Apikoplastenmembranen und zur Topologiebestimmung des Proteins genutzt werden. Aufgrund der Tatsache, dass Toc75 als ein OMP85 Protein in der äußeren Chloroplastenmembran vorliegt, und die dritte Apikoplastenmembran homolog zu dieser ist, liegt die Vermutung nahe, dass TgOMP85 eine Komponente eben dieser 3. Membran darstellt. Dieses Modell wird durch die Arbeit von Bullmann und Kollegen unterstützt, in welcher PtOMP85 in der dritten Plastidenmembran der Diatomee *P. tricornutum* identifiziert wurde.

Zur Überprüfung des experimentellen Systems wurden verschiedene, bekannte Apikoplasten-Markerproteine zusammen mit den zwei unterschiedlich großen GFP-Fragmenten in den TUB8mycGFPMyoATy-HX\_117-Vektor kloniert. Bei diesen Markerproteinen handelte es sich einerseits um einen Bereich des „*T. gondii* apicoplast cell division cycle 48 Proteins“ (TgCdc48ap\_1-256aa), welches im periplastidären Kompartiment vorzufinden ist und andererseits um einen Bereich des bereits erläuterten stromalen Markers TgFNR (TgFNR\_1-150aa). Da TgCdc48ap als AAA-Typ ATPase einen Teil des ERAD-ähnlichen Systems in der zweiten Apikoplastenmembran darstellt, sollte nach Durchführung einer Transfektion beider genannter TgCdc48ap Self-Assembling Split GFP Fusionsproteine während der IFA ein GFP-Signal im periplastidären Kompartiment (PPC) zu detektieren sein (Abbildung 3-17).



**Abbildung 3-17: Schematische Darstellung des Prinzips des Self-Assembling Split GFP Systems**

Zur Überprüfung der Funktionalität des Self-Assembling Split GFP Systems in *T. gondii* wurden die zwei, unterschiedlich großen GFP-Fragmente (β-FB 1-10 und β-FB 11) an einen Teil der ATPase TgCdc48ap\_1-256aa fusioniert. Nach Durchführung einer Transfektion und nachfolgender IFA sollte das Vorhandensein eines GFP-Signals überprüft werden, welches nur dann vorliegt, wenn beide GFP-Fragmente im selben Kompartiment (im PPC) lokalisiert sind.

Voraussetzung dafür ist eine gemeinsame Lokalisation des TgCdc48\_1-256aa + Self-Assembling Split GFP  $\beta$  Fal tblatt 1-10 Proteins (TgCdc48\_1-256aa<sup>GFP $\beta$ 1-10</sup>) mit dem TgCdc48\_1-256aa + Self-Assembling Split GFP  $\beta$  Fal tblatt 11 Protein (TgCdc48\_1-256aa<sup>GFP $\beta$ 11</sup>) im PPC.

Nach erfolgter transienter Transfektion und IFA der TgCdc48 Konstrukte war wider Erwarten kein GFP Signal detektierbar, obwohl beide Konstrukte als Positivkontrollen die beiden komplementären GFP-Fragmente enthielten (Abbildung 3-18 B). Trotz dieses negativen Zwischenergebnis wurden Kotransfektionen des Konstrukts mit den kodierenden Sequenzen für TgOMP85 und den  $\beta$ -Faltblätter 1-10 von GFP (TgOMP85<sup>GFP $\beta$ 1-10</sup>, 3-18A) gemeinsam mit den entsprechenden, an das 11.  $\beta$ -Faltblatt fusionierten Markerproteinen durchgeführt [(TgCdc28\_1-256aa<sup>GFP $\beta$ 11</sup>, TgFNR1-150aa<sup>GFP $\beta$ 11</sup>), Abbildung 3-18 D]. Jedoch ergaben auch diese Analysen keine Signale, so dass abschließend weder Aussagen über die Funktionalität des hier angewendeten Self-Assembling Split GFP-Systems, noch zur Fragestellung der Membranlokalisation beziehungsweise Topologie von TgOMP85 getroffen werden können.

### 3 Ergebnisse

A

TgOMP85



B

Positivkontrollen für das SA-Split GFP System:

TgCdc48ap\_1-256aa (Markerprotein für das PPC)

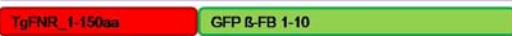
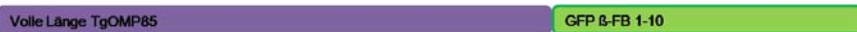
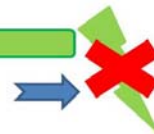
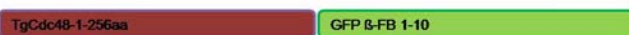
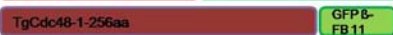


TgFNR\_1-150aa (Markerprotein für das Stroma)



C

Negativkontrollen für das SA-Split GFP System:



D



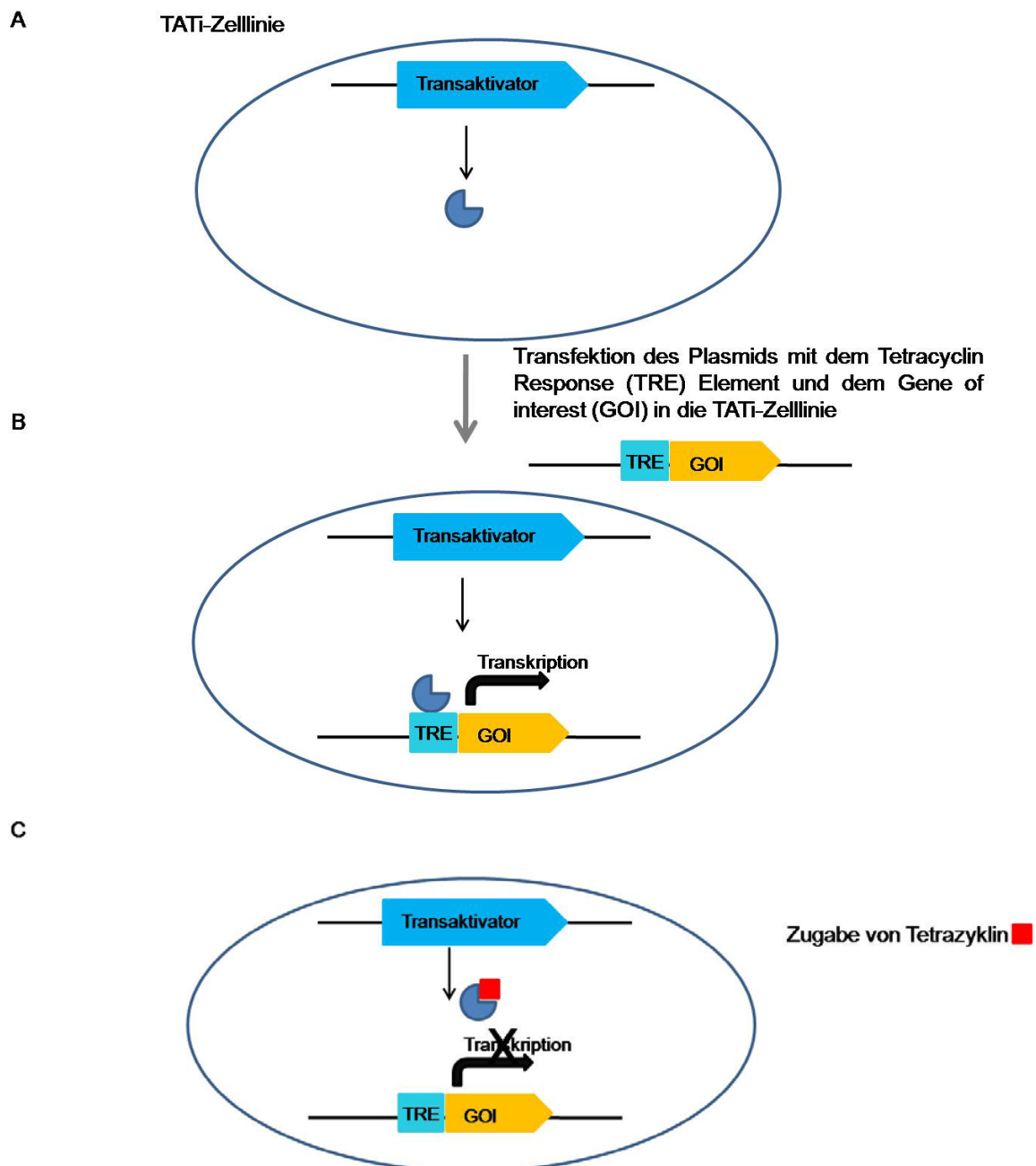
**Abbildung 3-18: Schematische Darstellung der Self-Assembling Split GFP-Fusionsproteine**

Für die Analyse einer möglichen Lokalisation von TgOMP85 in einer der insgesamt vier Apikoplastenmembranen wurden verschiedene Fusionsproteine generiert. A) Das vollständige TgOMP85 Protein fusioniert an GFP  $\beta$ -FB1-10. B) Die Positivkontrollen für das SA-Split GFP System. C) Die Negativkontrollen des Systems. D) Zur Klärung der intraorganellen Lokalisation und Topologie von TgOMP85 zu analysierende Fusionsproteine.

#### **3.10 Versuch der Herstellung einer konditionalen TgOMP85-Mutante zur Analyse der Funktion von TgOMP85 beim Proteintransport in den Apikoplasten**

Nach der eindeutigen Lokalisation von TgOMP85 im Apikoplasten von *T. gondii* durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen sollte im Anschluss daran dessen mögliche Funktion innerhalb des Proteintransports in die sekundäre Plastide und seine Notwendigkeit in Bezug auf die Viabilität des Parasiten analysiert werden. Dazu sollte eine konditionale TgOMP85-Mutante generiert und ein speziell für *T. gondii* angepasstes Tet-Off System (Meissner *et al.*, 2002) eingesetzt werden (die schematische Darstellung dieses Systems ist in Abbildung 3-19 dargestellt). Dieses durch Tetrazyklin regulierbare System basiert auf der Verwendung einer Parasitenlinie mit der Bezeichnung „TATi“ [trans activator trap identified (TATi) - Zelllinie, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Markus Meissner; Meissner *et al.*, 2002], welche einen durch Tetrazyklin regulierbaren Aktivator stabil exprimiert. In diese Parasitenlinie bringt man nachfolgend mit Hilfe von Elektroporation ein Plasmid ein, das neben dem „Gene of interest“ (GOI) das sogenannte „Tetracyclin Response Element“ (TRE) beinhaltet, an welches der genannte Transaktivator bindet und die Expression des zu untersuchenden Gens induziert. In Abwesenheit von Tetrazyklin findet die Bindung des Aktivators und damit die Expression des GOI statt, während in Anwesenheit des Tetrazyklins die Transkription und somit die Expression des GOI unterbleibt.

Das in dieser Arbeit verwendete und in die TATi-Zelllinie eingebrachte Plasmid T7Sag4HXGPRT (Toxo #112, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Markus Meissner) enthielt neben dem TRE das für das TgOMP85 voller Länge kodierende Gen. Um überprüfen zu können, inwieweit TgOMP85 für den Parasiten essentiell ist, und um eine mögliche Funktion beim Proteintransport charakterisieren zu können, sollte das endogene TgOMP85-Gen durch doppelte, homologe Rekombination eines Chloramphenicol Resistenzmarkers (DBCKO\_5'UTR\_KpnI\_CAT\_3'UTR\_BamHI\_NotI, Toxo #147) ersetzt werden. Auf diese Weise sollte nur noch die mit Tetrazyklin regulierbare Kopie des TgOMP85-Gens im Parasiten vorliegen.



**Abbildung 3-19: Schematische Darstellung des Tet-Off Systems**

Mit Hilfe der TATi-Linie, welche den Transaktivator stabil exprimiert (A), bringt man ein Plasmid ein, welches neben dem GOI auch das TRE enthält (B). In Abwesenheit von Tetrazyklin wird das GOI exprimiert, während in Anwesenheit von Tetrazyklin das TRE nicht durch den Transaktivator gebunden wird und die Transkription des GOI unterbleibt (C).

Durch eine transiente Transfektion der TATi-Linie mit dem Plasmid Toxo#112 -TgOMP85<sup>Ty</sup> sollte zunächst die Funktionsfähigkeit des Tet-Off Systems nachgewiesen werden. Sollte TgOMP85<sup>Ty</sup> in den transient transfizierten Parasiten in Abwesenheit von Tetrazyklin exprimiert werden, so sollte es durch fluoreszenzmikroskopische bzw. proteinbiochemische



Untersuchungen mit Hilfe des Maus Anti-Ty Antikörpers nachweisbar sein. Da bei diesen Analysen das Ty-markierte TgOMP85 jedoch weder durch eine Immunfluoreszenz im Parasiten noch in Western-Blots von Totallysaten nachgewiesen werden konnte, war es nicht möglich, weiterführende Analysen zum Nachweis der Funktion und Notwendigkeit des Proteins durchzuführen. Dies könnte in einer mangelhaften Expression des eingebrachten, markierten Proteins, begründet sein.

Ausgehend von dieser Vermutung wurde versucht, TATi-Zelllinien zu generieren, in welchen das Plasmid mit dem TgOMP85-Gen stabil in das Genom integriert vorliegt. Dieser Versuch verlief jedoch ebenfalls erfolglos, so dass über die Funktionalität von TgOMP85 mit Hilfe des Tet-Off Systems keine Aussage getroffen werden konnte.

#### **3.11 Heterologe Expression eines N-terminalen Fragments von TgOMP85**

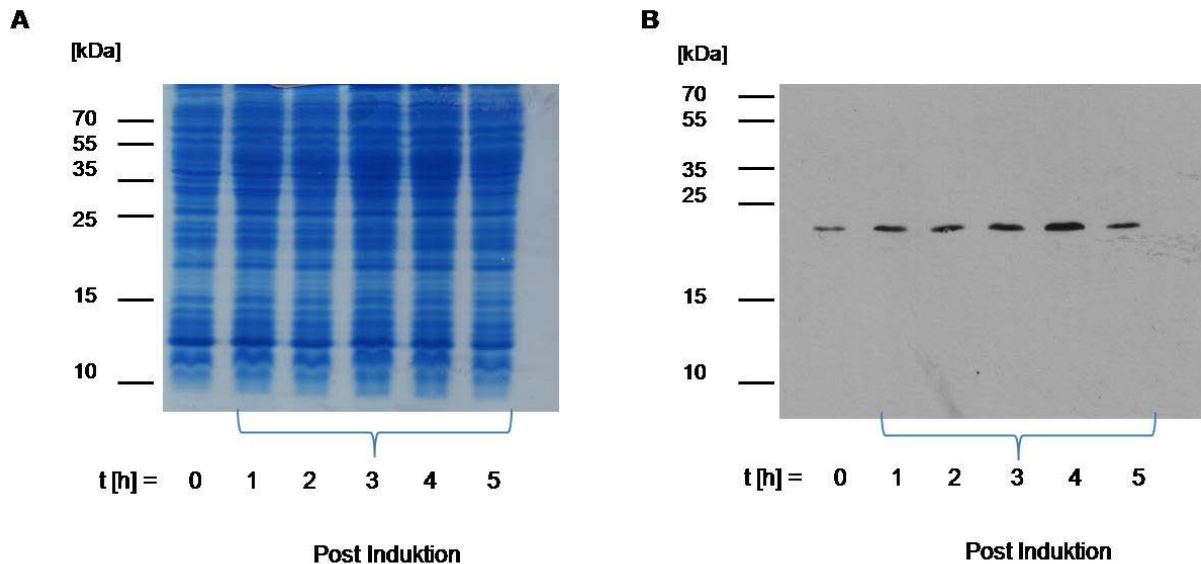
Die Lokalisation des endogenen TgOMP85 mit Hilfe der von Eurogentech bezogenen Antiseren und Antikörper (Abbildung 3-2) war nicht möglich. Aus diesem Grund sollte in einem weiteren Versuch ein Fragment von TgOMP85 heterolog exprimiert, aufgereinigt und für eine Immunisierung verwendet werden. Die aus dieser Immunisierung gewonnenen Seren sollten im Anschluss für eine Lokalisierung des endogenen TgOMP85 eingesetzt werden.

##### **3.11.1 Klonierung und Expression eines N-terminalen Fragments von TgOMP85**

Zu Expressionszwecken wurde ein N-terminales Fragment von TgOMP85 ausgewählt, das den Bereich zwischen der 91. und 259. Aminosäure umfasst. Ein Grund dafür, weshalb der Bereich zwischen der 91. und 259. Aminosäure für die Immunisierung ausgewählt wurde, liegt darin, dass dieser Bereich vermutlich nicht durch Prozessierungsvorgänge verändert wird und so einen Teil des reifen TgOMP85 Proteins bildet. Das Fragment wurde mittels PCR amplifiziert und über die generierten Adeninüberhänge in die Multiple Cloning Site des pQE30UA-Expressionsvektors kloniert. Vor der kodierenden Sequenz des N-terminalen Fragments von TgOMP85 befand sich die kodierende Sequenz für sechs Histidinreste, die später der Aufreinigung des exprimierten Fusionsproteins dienen sollten.

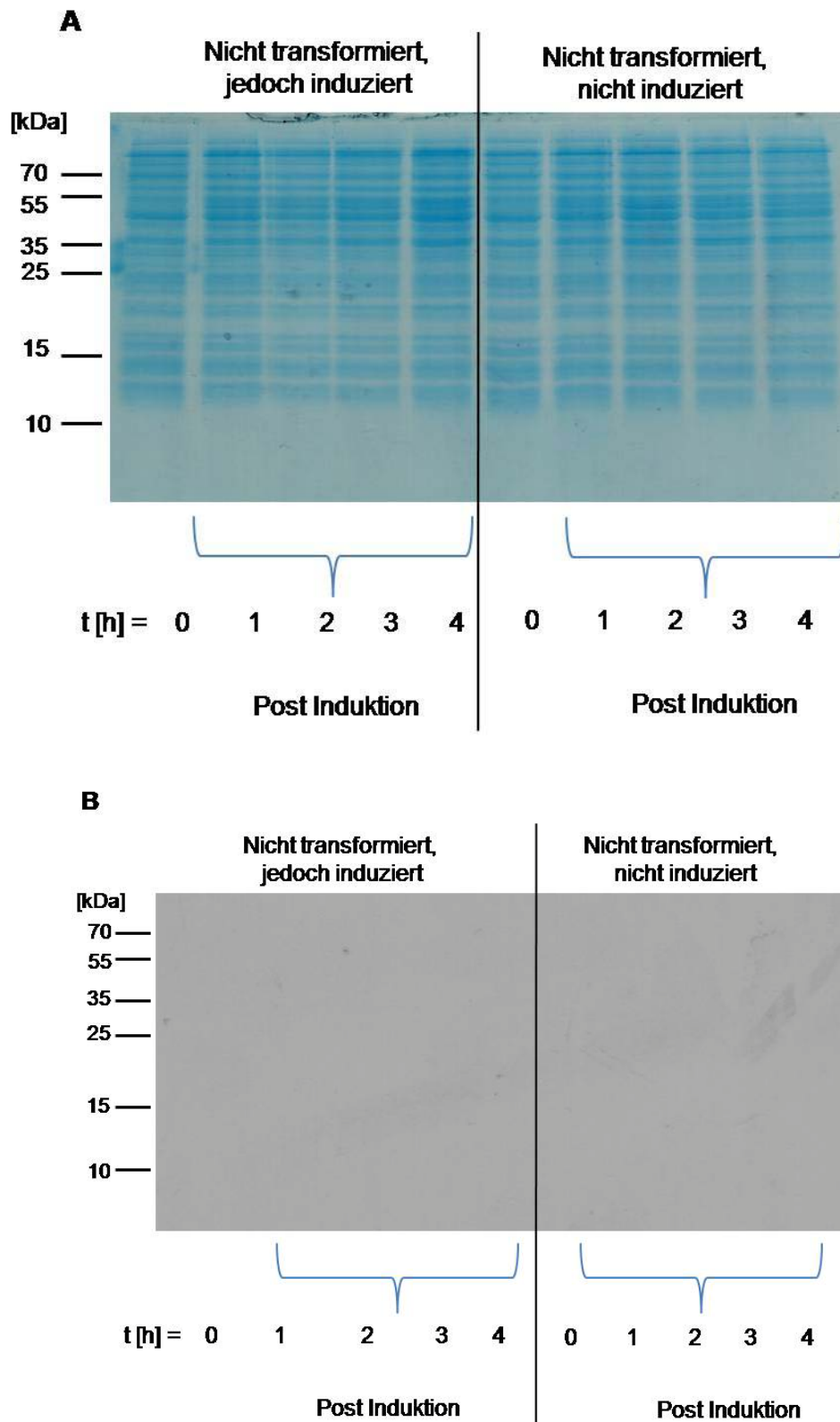
Um die Induzierbarkeit der Expression des Histidin-markierten, N-terminalen Fragments von TgOMP85 (TgOMP85<sup>91-259His</sup>) durch IPTG nachweisen zu können, wurde zunächst eine Testexpression durchgeführt. Hierzu wurde das für das N-terminale TgOMP85 Fragment kodierende Plasmid in *E. coli* (BL21 DE) transformiert und ein positiver Klon für die Inokulation der Kultur für die Testexpression verwendet. Die zu analysierenden Proben wurden vor und jeweils stündlich nach der Induktion entnommen, in Probenpuffer aufgekocht

und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Dabei wurde ein Gel für eine anschließende Comassie-Färbung verwendet, während ein zweites Gel einem Western-Blot unterzogen wurde. Wie anhand der in Abbildung 3-20A dargestellten Ergebnisse deutlich wird, war es schwierig in dem mit Comassie angefärbten SDS-Gel eine eindeutige Bande mit der erwarteten Masse des TgOMP85<sup>91-259His</sup> (18 kDa) zuzuordnen. Daher wurden die aufgetrennten Proteine im Western-Blot mit Hilfe eines Maus-anti-His Antikörpers zur Detektion des Histidin markierten Proteins analysiert. Betrachtet man das in Abbildung 3-20B dargestellte Ergebnis, so wurde eine Bande auf Höhe von ca. 20 kDa sichtbar. Diese könnte das TgOMP85<sup>91-259His</sup> darstellen, welches in diesem Fall jedoch bereits vor der Induktion mit IPTG in geringen Mengen detektierbar war. Der Grund hierfür mag in dem sogenannten Phänomen der „leaky Expression“ zu finden sein, bei der auch ohne Induktion mit IPTG bereits kleine Mengen des Proteins exprimiert werden. Nach erfolgter Induktion stieg die Konzentration dieses Proteins bis zu vier Stunden nach der Induktion stetig an, was sich in der Intensität der erhaltenen Banden widerspiegelt. Diese Ergebnisse weisen die Induzierbarkeit der Expression von TgOMP85<sup>91-259His</sup> nach.



**Abbildung 3-20: Testexpression des Histidin-markierten, N-terminalen Fragments von TgOMP85**

Zum Nachweis der Expression von TgOMP85<sup>91-259His</sup> wurden Proben einer Bakterienkultur zur Testexpression vor beziehungsweise zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Induktion entnommen, in Probenpuffer aufgekocht und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. A) Comassie gefärbtes, 15%-iges SDS-Gel, B) Western-Blot, als Primärantikörper wurde ein Maus-anti His Antikörper und als Sekundärantikörper wurde ein HRP gekoppelter Huhn-anti Maus Antikörper eingesetzt.



**Abbildung 3-21: Negativkontrolle zur Testexpression von TgOMP85**

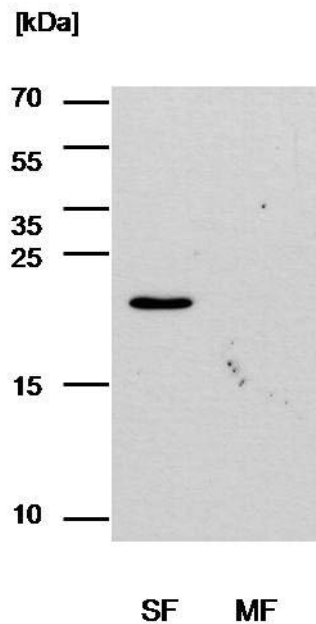
Als Negativkontrollen wurden die Proben von nicht transformierten, jedoch induzierten und nicht transformierten und nicht induzierten Bakterien verwendet. A) Coomassie gefärbtes, 15%-iges SDS-Gel, B) Western-Blot, als Primärantikörper wurde ein Maus-anti His Antikörper und als Sekundärantikörper wurde ein HRP gekoppelter Huhn-anti Maus Antikörper eingesetzt.

Als Negativkontrollen wurden zu den genannten Zeitpunkten sowohl Proben von nicht transformierten, jedoch induzierten, als auch von nicht transformierten und nicht induzierten *E. coli* BL21 (DE) entnommen und proteinbiochemisch analysiert (Abbildung 3-21).

Da sich in den Negativkontrollen keinerlei Banden mit dem Maus-anti-His Antikörper detektieren ließen, handelte es sich bei der im Western-Blot detektierten Bande auf der Höhe von ca. 20 k Da (Abbildung 3-20B) mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit um das aufzureinigende TgOMP85<sup>91-259His</sup>.

Zur Erleichterung der nachfolgenden Aufreinigung ist es von Vorteil, wenn das exprimierte Fusionsprotein in löslicher Form vorliegt. Aus diesem Grund wurde die Löslichkeit von TgOMP85<sup>91-259His</sup> durch eine Fraktionierung überprüft. Dazu wurde vier Stunden nach erfolgter Induktion ein Aliquot der Kultur einer Testexpression entnommen, die enthaltenen Bakterien sedimentiert und das Pellet in Lysepuffer aufgenommen. Durch mehrere Zyklen von Einfrieren und Auftauen wurden die Bakterien lysiert und die löslichen von membrangebundenen Proteinen durch einen anschließenden Sedimentationsschritt voneinander getrennt. Gleiche Zelläquivalente beider Fraktionen [lösliche (soluble fraction, SF) beziehungsweise Membran-Fraktion (membrane fraction, MF)] wurden über eine SDS-PAGE aufgetrennt und die jeweiligen Fraktionen im Western-Blot auf das Vorhandensein des TgOMP85<sup>91-259His</sup> hin untersucht.

Wie anhand des in Abbildung 3-22 dargestellten Western-Blots ersichtlich ist, lag das exprimierte TgOMP85<sup>91-259His</sup> in löslicher Form vor, so dass im Anschluss mit der Aufreinigung begonnen werden konnte.



**Abbildung 3-22: Überprüfung der Löslichkeit von TgOMP85<sup>91-259His</sup>**

Die Löslichkeit von TgOMP85<sup>91-259His</sup> wurde mit Hilfe einer Fraktionierung des Bakterienlysats überprüft. TgOMP85<sup>91-259His</sup> wurde ausschließlich in der löslichen (soluble fraction, SF) und nicht in der membrangebundenen (membrane fraction, MF) detektiert. Als Primärantikörper wurde ein Maus-anti His Antikörper verwendet. Als Sekundärantikörper wurde ein HRP gekoppelter Huhn-anti Maus Antikörper eingesetzt.

Anhand der hier aufgeführten Ergebnisse wird deutlich, dass sich die Expression des TgOMP85<sup>91-259His</sup> Proteins mit IPTG induzieren lässt. Trotz einer sogenannten „leaky Expression“ ist zu erkennen, dass nach Induktion die Konzentration des aufzureinigenden Proteins ansteigt, was sich in der ansteigenden Bandenintensität widerspiegelt. Ebenso wurde die Löslichkeit des TgOMP85<sup>91-259His</sup> Proteins durch eine Fraktionierung überprüft und bestätigt, so dass alle Voraussetzung für eine Aufreinigung erfüllt worden sind.

#### **3.11.2 Aufreinigung von TgOMP85<sup>91-259His</sup> mit Ni-NTA Agarose unter nativen Bedingungen**

Für die Aufreinigung von TgOMP85<sup>91-259His</sup> wurde eine 50 ml Kultur transformierter Bakterien verwendet und das durch einen Sedimentationsschritt gewonnene Bakterienpellet in Lysepuffer aufgenommen. Mit Hilfe einer French Press wurde der Aufschluss der Bakterien sichergestellt und die lösliche Fraktion der Proteine von der membrangebundenen über einen Sedimentationsschritt in der Ultrazentrifuge getrennt. Das hierbei entstandene Pellet wurde verworfen und der Überstand mit den darin enthaltenen löslichen Proteinen durch

einen Spritzenfilter (Porendurchmesser 0,22 µm) passiert, um sicher zu stellen, dass diese Fraktion keinerlei Membranmaterial beziehungsweise Schwebstoffe enthält. Die so gewonnenen löslichen Proteine wurden mit der entsprechenden Menge Ni-NTA Agarose inkubiert und die Aufreinigung von TgOMP85<sup>91-259His</sup> nach Angaben des Herstellers unter nativen Bedingungen durchgeführt. Unter optimalen Bedingungen ist dann zu erwarten, dass das Fusionsprotein nur in den einzelnen Elutionen und ohne weitere Kontaminanten detektierbar ist.

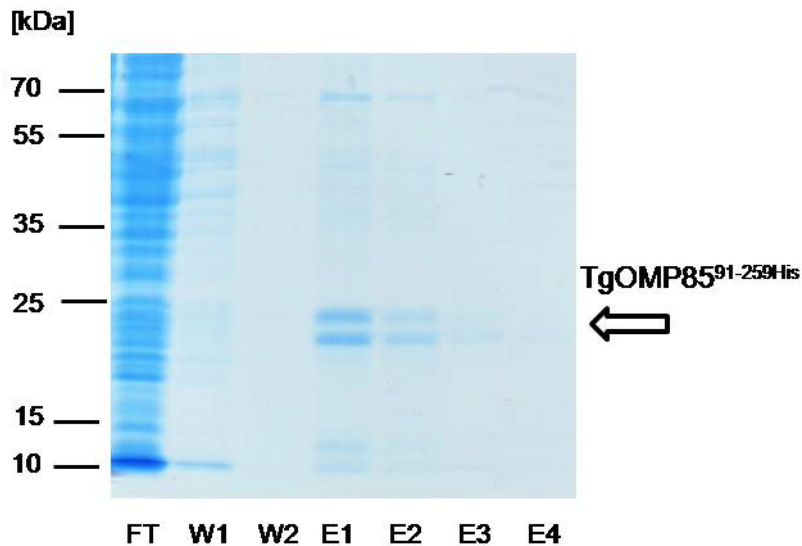
Betrachtet man das in Abbildung 3-23A abgebildete Comassie gefärbte SDS-Gel, so ist zu erkennen, dass im Durchfluss (Flow Through, FT) und in den beiden Waschfraktionen (W1, W2) keine eindeutig prominente Bande in der erwarteten Höhe von ca. 18 kDa zu identifizieren war. Vergleicht man diese Fraktionen mit den vier Elutionsfraktionen, so wird deutlich, dass letztere nicht nur ein Protein sondern mehrere Proteine unterschiedlicher Massen enthielten, die offenbar ebenso an die Ni-NTA Agarose gebunden haben.

Um das aufzureinigende TgOMP85<sup>91-259His</sup> unter den in den Elutionen enthaltenen Proteinen identifizieren zu können, wurde ein parallel durchgeführter Western-Blot zu Detektionszwecken mit einem Maus-anti His Antikörper inkubiert. Bei Betrachtung des unter Abbildung 3-23B dargestellten Ergebnisses wird deutlich, dass weder im Durchfluss noch in den beiden Waschfraktionen ein His-getaggtetes Protein nachweisbar war. Dies bestätigt, dass keines der durch Comassie gefärbten Proteine im Durchfluss und in den Waschfraktionen das gewünschte Fusionsprotein repräsentierte und dieses effektiv durch die Ni-NTA Agarose gebunden wurde. Bei einer näheren Betrachtung der Comassie Färbung der einzelnen Elutionen wird deutlich, dass auf der für das TgOMP85<sup>91-259His</sup> zu erwartenden Höhe von ca. 18 kDa, zwei prominente Banden vorhanden sind. Es ist hierbei denkbar, dass das größere der beiden Proteine das His-getaggte Fusionsprotein repräsentiert, während das kleinere nur ein trunkiertes Fragment dessen darstellt. Vergleicht man jedoch die entsprechenden Fraktionen im Western-Blot, so ist deutlich zu erkennen, dass nur eine der beiden Bande durch den gegen den His-Tag gerichteten Antikörper detektiert wurde. Wenn es sich bei der unteren Bande tatsächlich um ein Fragment des am N-Terminus Histidin markierten Fusionsproteins handelt, so würde diese Bande eine vermutlich N-terminal trunkierte Form des Proteins darstellen, in der der His-Tag nicht mehr vorliegt.

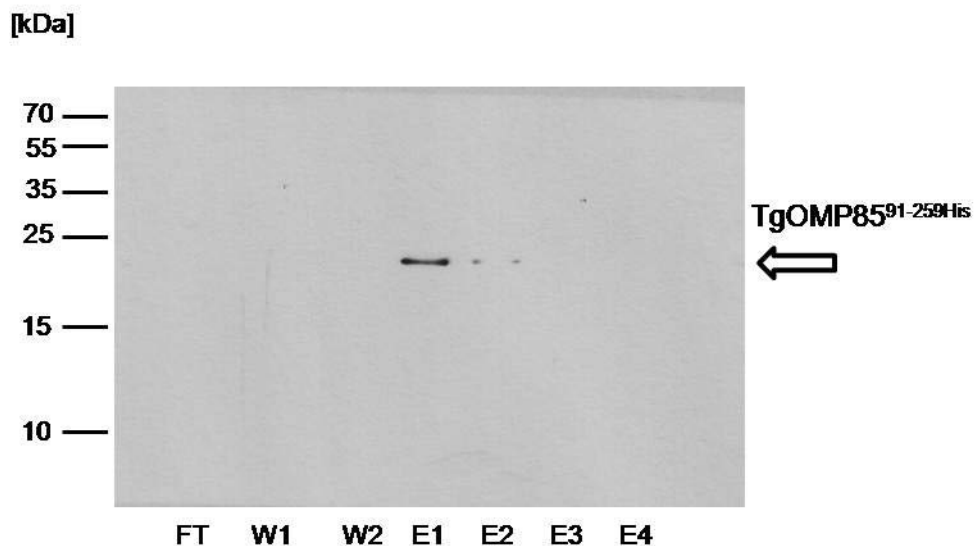
Eine andere, sehr prominente Kontaminante der Elutionsschritte ist auf Höhe von ca. 70 kDa in Abbildung 3-23A zu erkennen, wobei es sich möglicherweise um ein Hitzesschockprotein (HSP) handelte. Da HSP Nukleotidabhängig an ihre Substrate binden, wurde versucht diese Eigenschaft dazu auszunutzen, die Kontaminante von der Ni-NTA Agarose zu entfernen. Dem Waschpuffer wurde dazu 1mM ATP zugesetzt. Da die entsprechende Bande in den

einzelnen Elutionen jedoch weiterhin vorlag (Daten nicht gezeigt), wurde die Vermutung, dass es bei der Kontaminante um ein reines Hitzeschockprotein handelt, in Frage gestellt.

**A**



**B**



**Abbildung 3-23: Aufreinigung von TgOMP85<sup>91-259His</sup> mit Hilfe von Ni-NTA Agarose unter nativen Bedingungen**

Die in den einzelnen Fraktionen enthaltenen Proteine, die bei der Aufreinigung von TgOMP85<sup>91-259His</sup> gewonnen wurden, wurden über eine SDS-PAGE aufgetrennt. A) Zur Visualisierung der aufgetrennten Proteine, wurde das 15%-ige Gel mit Comassie angefärbt. B) Western-Blot, zur Detektion von TgOMP85<sup>91-259His</sup> wurde als Primärantikörper ein Maus-anti His Antikörper verwendet, als Sekundärantikörper wurde ein HRP gekoppelter Huhn-anti Maus eingesetzt. E: Elution, FT: Flow Through, Durchfluss, W: Waschfraktion.

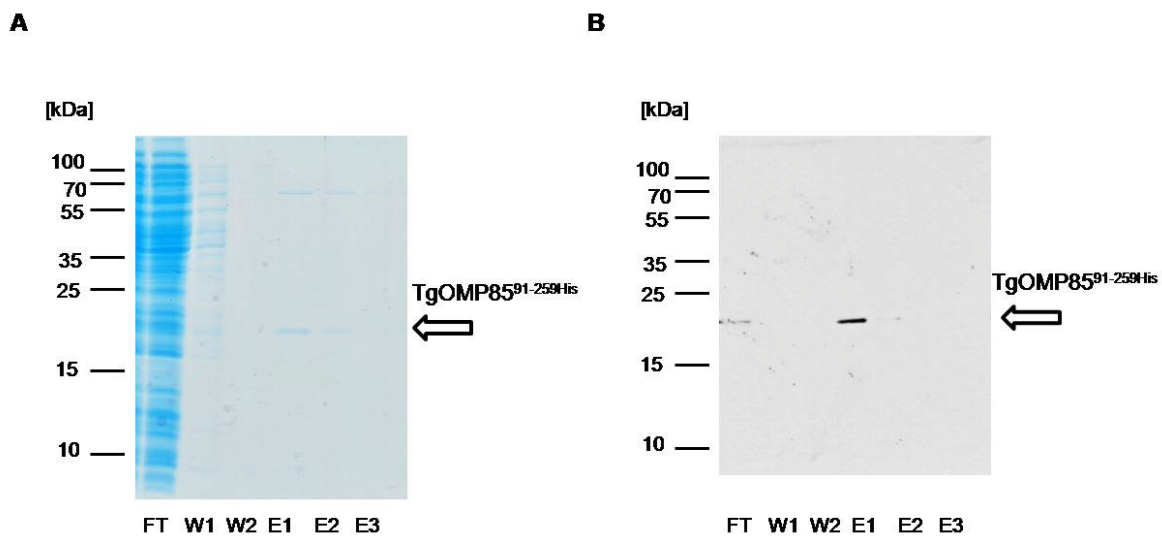
Eine Möglichkeit zur Entfernung dieser und anderer in den Elutionsschritten gefundenen Kontaminanten bestand darin, verschiedene Imidazolkonzentrationen im Waschpuffer einzusetzen. Bei Imidazol handelt es sich um eine heterozyklische Verbindung, die zur Elution des Fusionsproteins verwendet wird, indem es um die Bindungsstellen in der Ni-NTA Agarose mit den aufgereinigten Proteinen konkurriert. Durch den Einsatz einer geringfügig erhöhten Imidazolkonzentration sollte die angenommene schwache Bindung zwischen den Kontaminanten und Nickelionen aufgehoben werden, während jene starke Interaktion zwischen dem Histidin markierten TgOMP85<sup>91-259His</sup> und den Nickelionen bestehen bleiben sollte. Jedoch führte weder eine 50 mM noch eine 100 mM Imidazolkonzentration zu einer sauberen Aufreinigung von TgOMP85<sup>91-259His</sup> (Daten nicht gezeigt), so dass alternative Methoden zur Entfernung der Kontaminanten eingesetzt werden mussten.

#### **3.11.3 Aufreinigung von TgOMP85<sup>91-259His</sup> über Talon-Kobalt Affinitätschromatographie**

Eine weitere Möglichkeit zur Aufreinigung von Polyhistidin-markierten Proteinen besteht darin, eine Affinitätschromatographie über „Talon-Kobalt Resin“ (TKR) durchzuführen. Da diese Art der Aufreinigung auf einem ähnlichen Prinzip wie die in 3.11.2 genutzte Methode basiert (Aufreinigung mit Ni-NTA Agarose), wurde in einem weiteren Versuch die Aufreinigung von TgOMP85<sup>91-259His</sup> nach dem gleichen Protokoll durchgeführt. Da das positiv geladene Kobaltion im Vergleich zum ebenfalls positiv geladenen Nickelion eine weitaus größere Affinität zu Histidin aufweist, besteht die Möglichkeit, dass der Einsatz von TKR evtl. zu weniger Kontaminanten in den Elutionen und besserer Ausbeute des gewünschten Proteins führt. Das Ergebnis dieser Aufreinigung ist in Abbildung 3-24 dargestellt.

Abbildung 3-24A zeigt das mit den Aufreinigungsfraktionen beladene, im Anschluss mit Comassie angefärbte SDS-Gel, während Abbildung 3-24B den entsprechenden Western-Blot, der zur Detektion von TgOMP85<sup>91-259His</sup> mit dem Maus-anti His Antikörper inkubiert wurde, darstellt. Vergleicht man zunächst dieses Ergebnis mit dem in Abbildung 3-23 für die Aufreinigung mit Ni-NTA gezeigten, so fällt auf, dass die hierbei gewonnene Menge an Proteinen in den Elutionen trotz des gleichbleibend geladenen Volumens der Bakterienkultur (ein Probenvolumen äquivalent zu 200 µl Kultur), deutlich geringer ausgefallen war als bei der Aufreinigung mit der Ni-NTA Agarose. Dies könnte auf eine geringere Effizienz des TKR bei der Aufreinigung, hindeuten. Möglich wäre dabei eine ungenügende „Eluierbarkeit“ des TgOMP85 Fragments aufgrund der hohen Affinität der Kobaltionen gegenüber dem Histidin-Tag. Dagegen spricht jedoch das Vorhandensein der im Western-Blot reagierenden Bande in der Fraktion des Durchflusses.





**Abbildung 3-24: Aufreinigung von TgOMP85<sup>91-259His</sup> mit Talon-Kobalt Resin (TKR) unter nativen Bedingungen**

Da positiv geladene Kobaltionen im Vergleich zu Nickelionen eine höhere Affinität zu Histidin aufweisen, wurde eine Aufreinigung mit TKR durchgeführt, um Kontaminanten zu eliminieren. A) Comassie gefärbtes, 15%-iges SDS-Gel; B) Western-Blot, eingesetzter Primärantikörper war ein Maus-anti His, als Sekundärantikörper wurde ein HRP gekoppelter Huhn-anti Maus Antikörper eingesetzt. E: Elution, FT: Flow Through, Durchfluss, W: Waschfraktion.

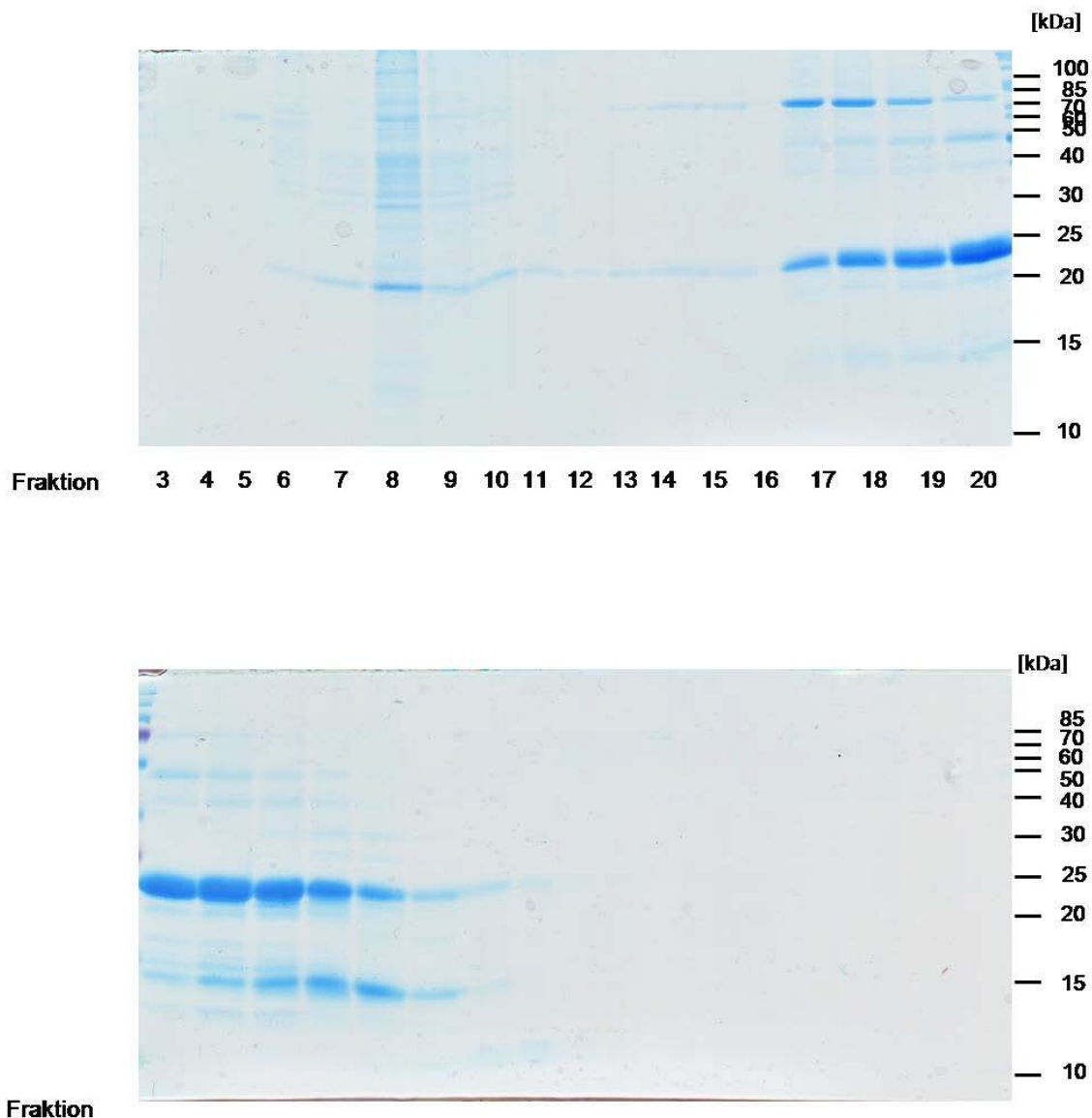
Gleichzeitig zur geringeren Ausbeute bei der Elution der Proteine, nahm auch die Intensität der den Kontaminanten entsprechenden Banden ab, wobei es nicht möglich war, alle Kontaminanten zu eliminieren.

Ausgehend von diesen und den zuvor geschilderten Ergebnissen lässt sich somit schlussfolgern, dass eine Aufreinigung von TgOMP85<sup>91-259His</sup> über die angewendeten Affinitätschromatographiemethoden nicht kontaminationsfrei durchgeführt werden konnte. Daher wurde im Anschluss eine Aufreinigung durch Gelfiltration versucht.

#### 3.11.4 Aufreinigung von TgOMP85<sup>91-259His</sup> mit Hilfe der Gelfiltrationsmethode

Die bisher erzielten Ergebnisse zur Aufreinigung von TgOMP85<sup>91-259His</sup> zeigten, dass die gewonnenen Elutionen neben dem gewünschten Protein stets weitere Kontaminanten enthielten. Diese konnten weder durch eine höhere Imidazolkonzentration im Waschpuffer, noch durch Einsatz von ATP im selbigen, oder den Gebrauch von verschiedenen affinitätschromatographischen Matrices eliminiert werden. Da es sich bei den Kontaminanten offensichtlich um Proteine mit unterschiedlichen Massen handelte, wurde in einem weiteren Experiment versucht, die Proteine bei einer Gelfiltration nach ihrer jeweiligen Masse

aufzutrennen und eine Fraktion zu identifizieren, welche nur das aufzureinigende Fusionsprotein enthielt. Für diese Art der Affinitätschromatographie wurde die erste Elutionsfraktion (E1) aus einer Aufreinigung mit Ni-NTA Agarose und eine Superdex 200 HR 10/30 Säule verwendet. Die Gelfiltration wurde nach dem Protokoll des Säulenherstellers durchgeführt, und die dabei gewonnenen Fraktionen mit TCA präzipitiert und anschließend für die proteinbiochemische Analyse genutzt.



**Abbildung 3-25: Aufreinigung von TgOMP85<sup>91-259His</sup> durch Gelfiltration**

Um die zuvor mitaufgereinigten Kontaminanten von TgOMP85<sup>91-259His</sup> zu trennen, wurde eine Gelfiltration nach vorhergehender Ni-NTA Affinitätschromatographie durchgeführt. Die dabei gewonnenen Fraktionen wurden präzipitiert und mit Hilfe einer SDS-PAGE aufgetrennt. Zur Visualisierung der in den Fraktionen enthaltenen Proteine wurde das hierbei verwendete 15%-ige Gel mit Comassie angefärbt.

Wie in Abbildung 3-25 zu sehen ist, wurden ca. 30 Fraktionen gewonnen, wobei Proteine höherer Masse in den ersten Fraktionen und solche niedrigerer Masse in den hinteren Fraktionen lokalisiert sein sollten. Betrachtet man jedoch das Ergebnis der Gelfiltration, so ist deutlich zu erkennen, dass die ersten Fraktionen (Fraktion 3-15) neben den erwarteten Proteinen höherer Masse (~70-100 kDa) auch Proteine beinhalten, die eine Masse von 25-50 kDa aufweisen. Die erwartete Auftrennung erfolgte in diesem Fall nicht effizient genug. In den restlichen Fraktionen fand zwar eine Anreicherung von Proteinen geringerer Masse (15-25 kDa) statt, jedoch erfolgte kein Ausschluss der Proteine größeren Gewichts und somit keine Auftrennung beziehungsweise Aufreinigung, die fein genug gewesen ist.

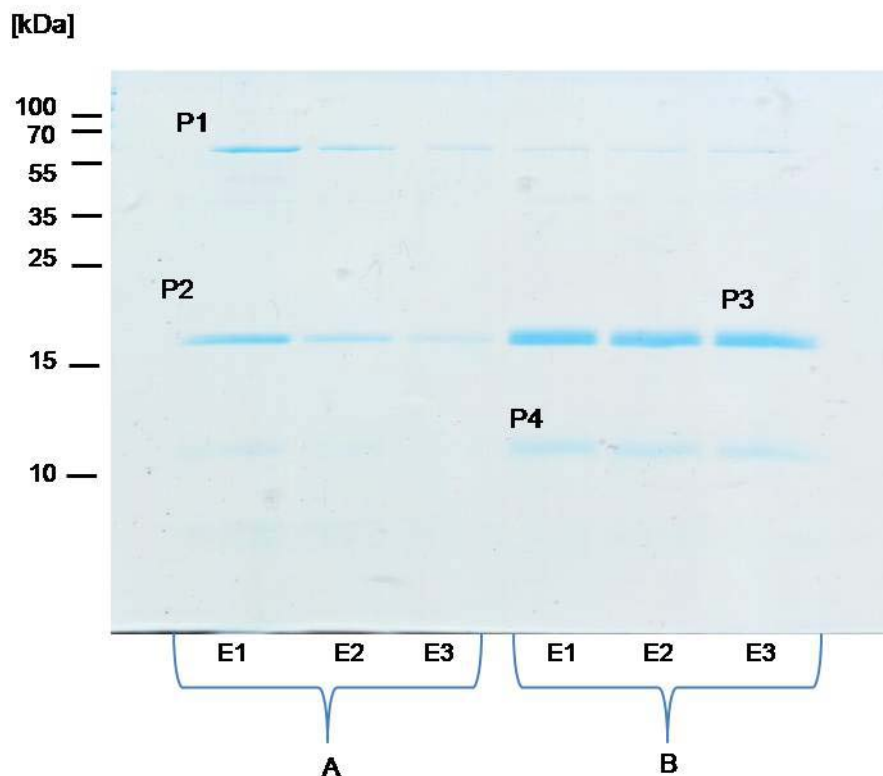
Auch die Gelfiltration erwies sich somit als ungeeignet, das TgOMP85<sup>91-259His</sup> von Kontaminanten zu befreien und anzureichern. Die gewonnenen Daten lassen vermuten, dass zwischen den mitaufgereinigten Proteinen und dem genannten Fragment eine starke Interaktion bestehen könnte, die eine erfolgreiche Aufreinigung verhinderte.

#### **3.11.5 Identifizierung der Kontaminanten mit Hilfe von MALDI-TOF Analysen**

Um die auftretenden Kontaminanten durch spezifisch auf deren Eigenschaften abgestimmte Verfahren von dem aufzureinigenden TgOMP85<sup>91-259His</sup> trennen zu können, mussten diese zunächst identifiziert werden. Dafür wurden die Proteine aus jeweils drei Elutionsfraktionen (E1-E3), welche bei einer Aufreinigung mit Ni-NTA Agarose beziehungsweise TKR gewonnen wurden, mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Zur Visualisierung der Proteine wurde das Gel mit Comassie angefärbt und die prominenten Banden für die nachfolgende MALDI-TOF Analyse aus dem Gel ausgeschnitten. Die Analysen zur Identifizierung wurden freundlicherweise von Herrn Kahnt (MPI Marburg) durchgeführt.

Die Ergebnisse der MALDI-TOF Analysen zeigten, dass es sich bei dem Protein mit einer Masse von ca. 70 kDa (Abbildung 3-26, P1) um ein bakterielles Chaperon handelte, während das zweite analysierte Protein (P2) auf der Höhe von ca. 20 kDa nicht identifiziert werden konnte. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass es sich hierbei um das gesuchte TgOMP85<sup>91-259His</sup> handelte. Bei der auf Höhe von ca. 12 kDa laufenden Bande (P4) handelte es sich hingegen mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit um das gesuchte TgOMP85<sup>91-259His</sup>. Die Masse dieser Bande ist jedoch um ca. 6 kDa zu gering, um das gesamte TgOMP85<sup>91-259His</sup> repräsentieren zu können. Da diese Bande bisher noch in keinem der mit einem Anti-His Antikörper detektierten Western-Blots zu erkennen war, liegt die Vermutung nahe, dass es sich hierbei um ein N-terminal verkürztes Produkt von TgOMP85<sup>91-259His</sup> handelt, welches keinen intakten His-Tag mehr trägt. Dieses könnte zum Beispiel durch Degradation der

bereits aufgereinigten Probe, zum Beispiel bei der Probenaufbereitung oder Probenlagerung entstehen. Das parallel dazu mit aufgereinigte Protein (P3) stellt eine auch als Sly (sensitive to lysis) D oder „Histidin rich protein“ bezeichnete, bakterielle Isomerase mit einer ungefähren Masse von ca. 20 kDa dar. Es ist nicht auszuschließen, dass SlyD dabei das intakte TgOMP85<sup>91-259His</sup> in der Bande überlagert und eine Identifikation des Proteins innerhalb der als P3 bezeichneten Bande unmöglich macht. Die zuvor in den mit Anti-His Antikörpern durchgeführten Western Blots detektierte Bande bei knapp 20 kDa (Abbildung 3-23 und 3-24) entspräche dann dem intakten TgOMP85<sup>91-259His</sup>.



**Abbildung 3-26: Identifizierung der Kontaminanten durch MALDI-TOF Analyse**

Für die Identifizierung der ko-eluierten Kontaminanten wurden die in den Elutionen enthaltenen Proteine aus einer Aufreinigung mit A) Ni-NTA Agarose bzw. B) TKR über ein SDS-Gel aufgetrennt. Um diese Proteine sichtbar machen zu können, wurde das 15%-ige Gel mit Comassie angefärbt. Einige der Banden wurden zur Identifizierung aus dem Gel ausgeschnitten und einer MALDI-TOF Analyse unterzogen.

Bei SlyD handelt es sich um die FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans Isomerase, die im Cytoplasma von *E. coli* vermutlich eine Funktion bei der Proteinfaltung hat (Scholz *et al.*, 2006). Da SlyD einen Histidinreichen C-Terminus besitzt und bevorzugt an bi valente

Kationen wie Nickel und Zink, aber auch Kobalt, Kupfer bindet (Mitterauer *et al.*, 1999; Wülfing *et al.*, 1994), ist es eine bekannte Kontaminante bei Aufreinigungen von Polyhistidin-markierten Proteinen (Robichon *et al.*, 2011). Dies erklärt, warum dieses Protein als Kontaminante bei allen angewendeten affinitätschromatographischen Methoden effizient mitaufgereinigt wurde und nicht von TgOMP85<sup>91-259His</sup> zu trennen war.

Da es sich bei der Kontaminante auf der Höhe von 70 kDa um ein Hitzeschockprotein bzw. Chaperon handelt und bereits erfolglos versucht wurde dieses durch Modifizierung der ATP-Konzentration im Waschpuffer zu entfernen, lag die Konzentrationin darauf, die prominentere Kontaminante, das SlyD Protein, zu eliminieren.

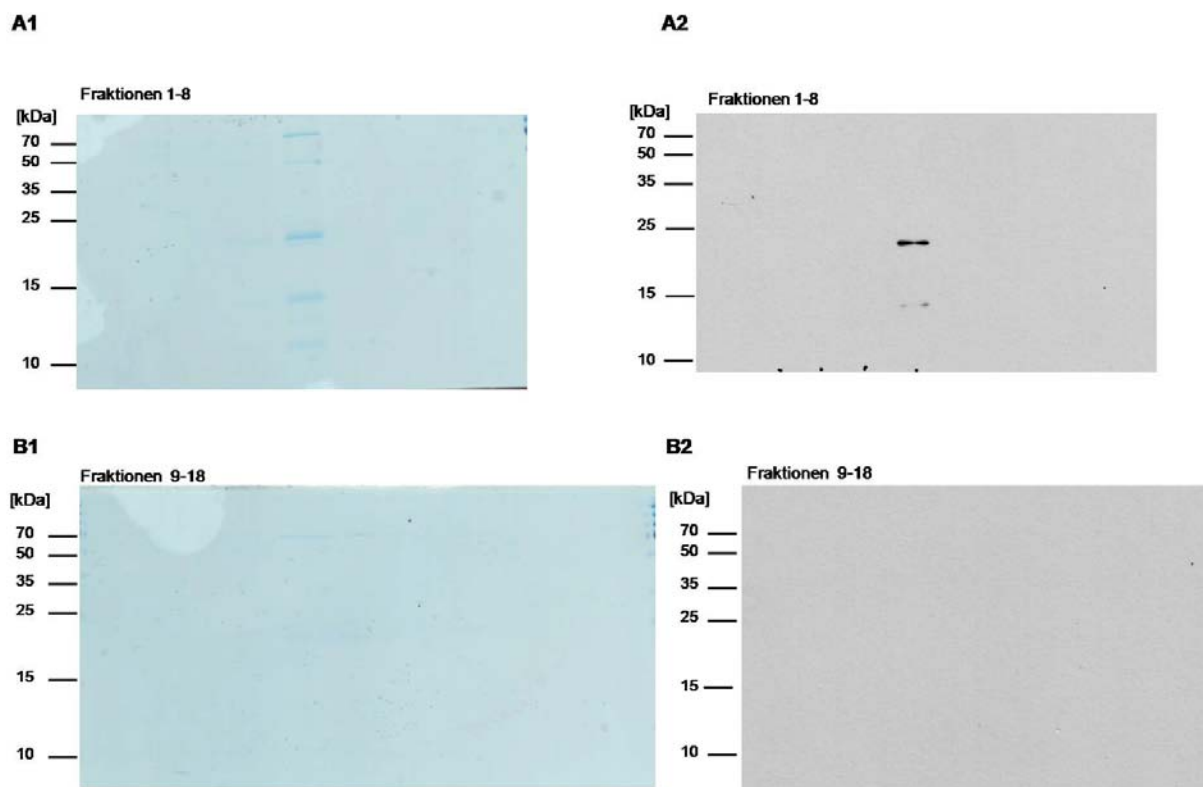
#### **3.11.6 Durchführung einer Ionenaustauschchromatographie zur Entfernung des kontaminierenden SlyD Proteins**

Eine Möglichkeit SlyD aus den E lutionen der Affinitätschromatographie zu entfernen, bestand in der Durchführung einer Ionenaustauschchromatographie. Dazu wurden zunächst die Ladungen des aufzureinigenden TgOMP85<sup>91-259His</sup> und der genannten Kontaminante bei einem pH-Wert von 7 ermittelt, um überprüfen zu können, in wie weit sich diese voneinander unterscheiden. Dieser Wert bestimmt die Art der für die Chromatographie zu verwendenden Säule (Anionen- bzw. Kationenaustauscher). Die theoretischen Analysen zur Berechnung der entsprechenden Ladungen ([http://molbiol-tools.ca/Protein\\_Chemistry.htm](http://molbiol-tools.ca/Protein_Chemistry.htm)) ergaben, dass bei einem neutralen pH-Wert von 7 TgOMP85<sup>91-259His</sup> mit einer Ladung von +10 und SlyD mit einer Ladung von -23 vorliegt. Daher wurde die Ionenaustauschchromatographie mit einer MonoQ-Säule nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Bei der verwendeten Säule handelte es sich um einen Anionenaustauscher, an den aufgrund der positiven Ladung negativ geladene Proteine binden, während positiv geladene Proteine keine Interaktion mit dem Säulenmaterial eingehen und die Säule daher passieren. Dementsprechend sollte TgOMP85<sup>91-259His</sup> in den ersten gewonnenen Fraktionen vorliegen, während die Kontaminante SlyD erst nach einer Elution in den letzten Fraktionen zu erwarten ist.

Bei genauer Betrachtung der in Abbildung 3-27 dargestellten Ergebnisse wird jedoch deutlich, dass die ersten Fraktionen (Fraktion 1-8) größtenteils keinerlei Proteine enthielten, jedoch eine Fraktion darunter war, die mehrere Proteine unterschiedlicher Masse aufwies (Abbildung 3-27, A1). Vergleicht man diese Fraktion im Comassie gefärbten Gel mit der entsprechenden Fraktion im Western-Blot (Abbildung 3-27, A2), so ist zu erkennen, dass der Maus-anti His Antikörper zwei Proteine detektiert hat. Dabei handelte es sich einerseits um eine Bande auf Höhe von ca. 20 kDa und andererseits um eine auf Höhe von ca. 15 kDa. Da

### 3 Ergebnisse

in den Negativkontrollen der Testexpression keinerlei Protein detektiert wurde, könnte es sich bei der höher gelegenen Bande um das vollständige TgOMP85<sup>91-259His</sup> handeln, während die untere Bande ein am C-Terminus trunkiertes TgOMP85<sup>91-259His</sup> Fragment repräsentieren könnte. In Jedem Fall war es nicht möglich, das aufzureinigende TgOMP85<sup>91-259His</sup> von den angenommenen Kontaminanten zu trennen, obwohl sich diese bei neutralem pH deutlich in ihrer Ladung unterscheiden und so unterschiedlich mit dem Säulenmaterial interagieren sollten. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte vielleicht in einer Interaktion zwischen dem gesuchten und den entsprechenden Kontaminanten liegen.



**Abbildung 3-27: Ergebnis der Ionenaustauschchromatographie zur Eliminierung von SlyD**

Basierend auf unterschiedlichen Ladungen bei neutralen pH-Wert wurde versucht die Kontaminante SlyD aus den Elutionen einer vorhergegangenen Ni-NTA Aufreinigung zu entfernen. SlyD trägt bei neutralem pH eine Ladung von -23 und TgOMP85<sup>91-259His</sup> eine positive Ladung von +10. A1) Coomassie gefärbtes SDS-Gel der Fraktionen 1-8. A2) Western-Blot der Fraktionen 1-8. B1) Coomassie gefärbtes SDS-Gel der Fraktionen 9-18. B2) Western Blot der Fraktionen 9-18. Als Primärantikörper wurde ein Maus-anti His Antikörper verwendet. Als Sekundärantikörper wurde ein HRP gekoppelter Huhn-anti Maus Antikörper eingesetzt.

In Anbetracht der hier dargestellten Ergebnisse wird deutlich, dass weder die verschiedenen affinitätschromatographischen Methoden noch eine Gelfiltration bzw. Ionenaustauschchromatographie zu einer ausreichenden, kontaminationsfreien Aufreinigung des TgOMP85<sup>91-259His</sup> Proteins geführt haben. Basierend darauf, war eine Immunisierung mit diesem Protein nicht möglich, weshalb die Lokalisation des endogenen TgOMP85 in *T. gondii* nicht untersucht werden konnte. Eine abschließende Aussage zur Lokalisation von TgOMP85 in *T. gondii* ist daher nur für die markierten Proteine möglich. Diese stehen jedoch mit der erwarteten Lokalisation im Apikoplasten in Kongruenz.

#### **3.12 Versuch der heterologen Expression von TgOMP85**

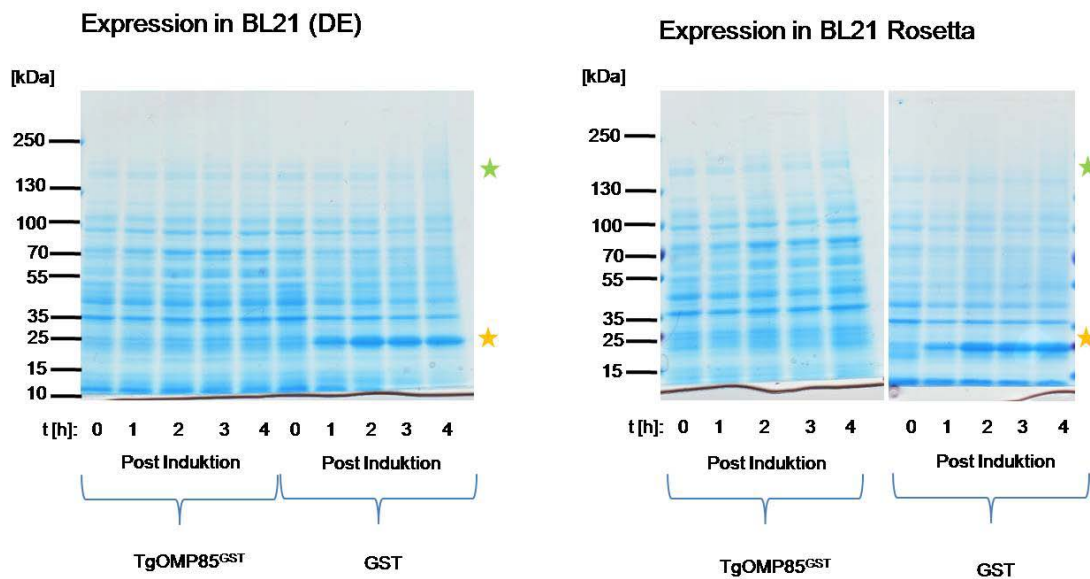
Der Versuch TgOMP85<sup>91-259His</sup> mit Hilfe verschiedener Methodiken aufzureinigen, verlief ohne Erfolg. Aus diesem Grund sollte in einem weiteren Experiment das vollständige TgOMP85 heterolog exprimiert, aufgereinigt und für eine Immunisierung verwendet werden. Die Seren, die bei dieser Immunisierung gewonnen werden, sollten für eine weitere Lokalisationsstudie des endogenen TgOMP85 verwendet werden. Darüber hinaus sollte das aufgereinigte TgOMP85 dazu genutzt werden, dessen elektrophysiologischen Eigenschaften, wie zum Beispiel die Ionenselektivität und der Porendurchmesser, zu bestimmen, mit deren Hilfe die Zuordnung von TgOMP85 zu einer der beiden Subtypen (Toc- bzw. Subtyp) der OMP85-Familie erfolgen könnte.

##### **3.12.1 Klonierung und Expression von TgOMP85<sup>GST</sup>**

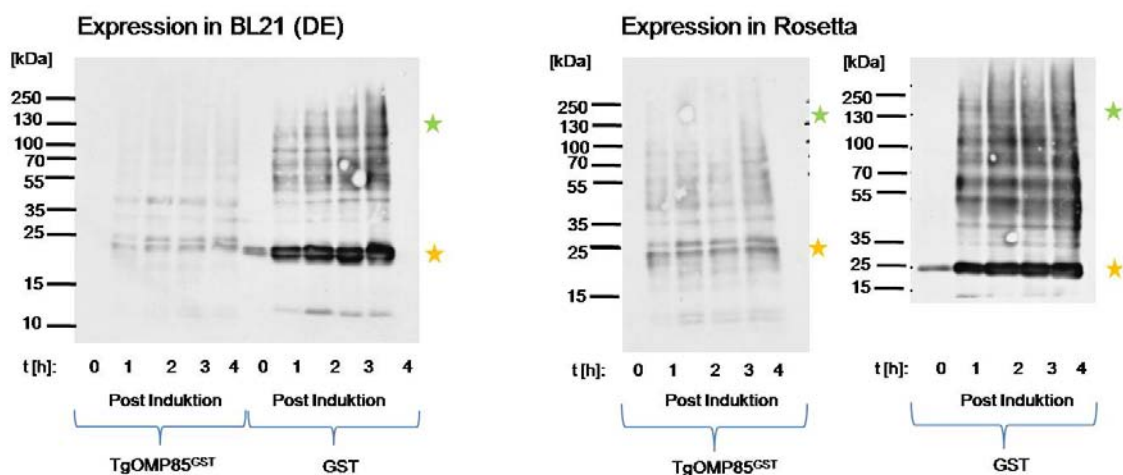
Zu Expressionszwecken wurde die kodierende Sequenz von TgOMP85 über die *EcoRI*- und *NotI*-Schnittstellen in den pGEX-5x-3 Expressionsvektor kloniert. Vor der kodierenden Sequenz von TgOMP85 befand sich die kodierende Sequenz für die Glutathion-S-Transferase (GST), die später der Aufreinigung des exprimierten Fusionsproteins (TgOMP85<sup>GST</sup>) dienen sollte. Um die Induzierbarkeit der Expression von TgOMP85<sup>GST</sup> und des GST-Tags durch IPTG nachweisen zu können, wurde zunächst eine Testexpression durchgeführt. Hierzu wurde das für TgOMP85<sup>GST</sup> kodierende Plasmid in *E. coli* [BL21 (DE) und BL21 Rosetta] transformiert und positive Klone zur Inokulation der Kulturen für die Testexpression verwendet. Als Positivkontrolle wurde auch ein Plasmid, welches nur für den GST-Tag allein kodiert, in die beiden genannten Bakterienstämme transformiert und die dazu gehörende Testexpressionen durchgeführt. Die zu analysierenden Proben wurden vor und jeweils stündlich nach der Induktion entnommen, in Probenpuffer aufgekocht und mittels

SDS-PAGE aufgetrennt. Dabei wurde ein Gel für eine anschließende Comassie-Färbung verwendet, während ein zweites Gel einem Western-Blot unterzogen wurde.

A



B



**Abbildung 3-28: Testexpression von TgOMP85<sup>GST</sup> in BL21(DE) und Rosetta**

Zum Nachweis der Expression von TgOMP85<sup>GST</sup> und dem GST-Tag wurden Proben von Bakterienkulturen vor beziehungsweise zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Induktion entnommen, in Probenpuffer aufgekoht und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. A) Comassie gefärbte SDS-Gele (7,5-15%). B) Western-Blots, als Primärantikörper wurde ein Ziege anti-GST Antikörper, als Sekundärantikörper wurde ein HRP gekoppelter Kaninchen anti- Ziege Antikörper eingesetzt.



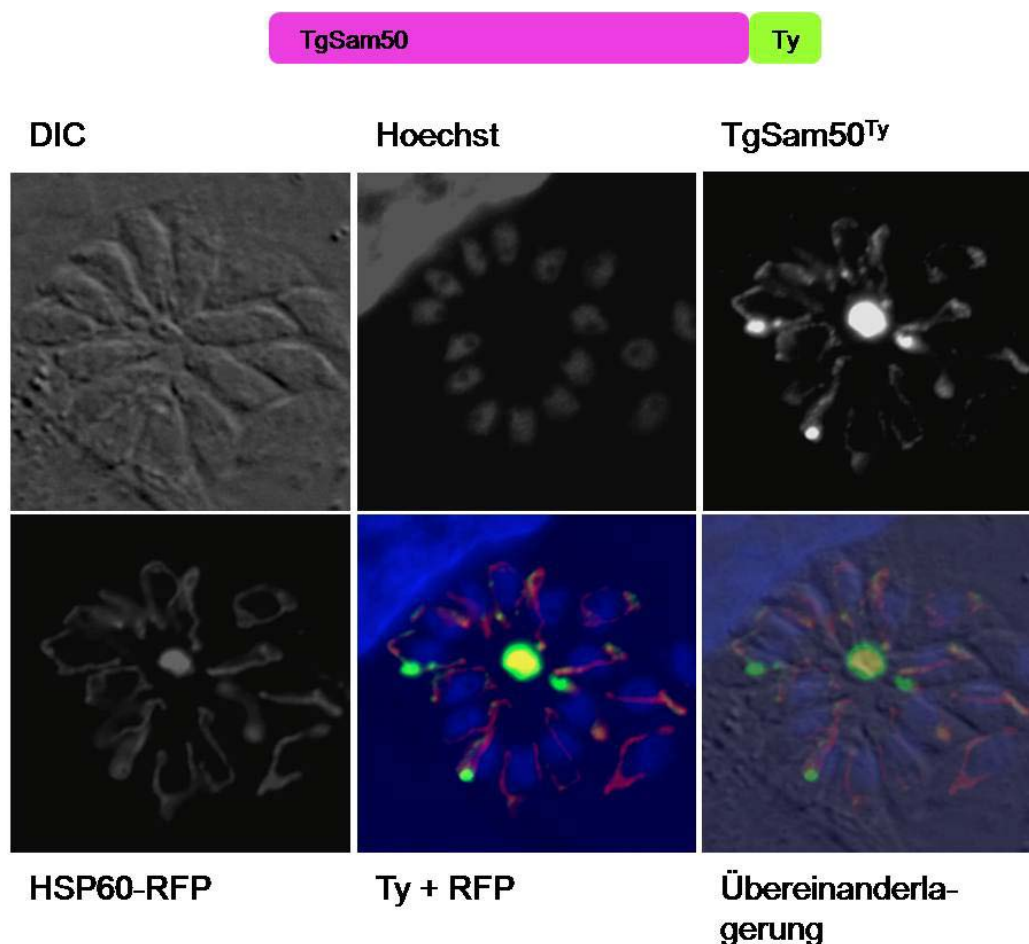
Wie anhand der in Abbildung 3-28A dargestellten Ergebnisse deutlich wird, war es schwierig in den mit Comassie angefärbten SDS-Gelen eindeutige Banden mit einer Masse von ~ 180 kDa (erwartete Masse von TgOMP85<sup>GST</sup>, ★) bzw. einer von 26 kDa (erwartete Masse für den des GST-Tag, ★) zu identifizieren. Daher wurden die aufgetrennten Proteine im Western-Blot mit Hilfe eines Ziege-anti-GST Antikörpers zur Detektion des GST markierten Proteins und des GST-Tags allein analysiert. Betrachtet man das in Abbildung 3-28B dargestellte Ergebnis, so konnte weder in den Lysaten der BL21(DE) noch in denen der BL21 Rosetta, die mit dem für TgOMP85<sup>GST</sup> kodierenden Plasmid transformiert wurden, eine Bande auf Höhe von ~180 kDa detektiert werden. Dies ließ darauf hindeuten, dass TgOMP85<sup>GST</sup> in keinem der beiden Bakterienstämme exprimiert wurde beziehungsweise die Expression so gering war, dass TgOMP85<sup>GST</sup> nicht detektiert werden konnte.

Vergleicht man dazu die Proben der Positivkontrolle (GST), so wird anhand der Banden auf der Höhe von ca. 25 kDa deutlich, dass der GST-Tag allein im Vergleich zu TgOMP85<sup>GST</sup> offensichtlich exprimiert wurde. Jedoch lag für dieses Protein eine „leaky“ Expression vor, was anhand der Bande in der Probe, welche vor der Induktion entnommen wurde, eindeutig zu erkennen ist. Des Weiteren waren in den Proben der Positivkontrolle neben der vermutlichen GST-Bande auch andere Proteine höherer Masse mit dem anti-GST Antikörper detektierbar. Um welche Proteine es sich dabei handelt, blieb ungeklärt, wobei eine unspezifische Kreuzreaktion mit endogenen Proteinen von *E. coli* nahe liegt. Diese Banden wurden ebenfalls auch in jenen Proben detektiert, in welchen das TgOMP85<sup>GST</sup> hätte vorliegen sollen.

Anhand dieser Ergebnisse lässt sich somit schlussfolgern, dass die Testexpression von TgOMP85<sup>GST</sup> erfolglos verlief. Aufgrund der begrenzten Zeit konnten die Bedingungen für die Expression von TgOMP85<sup>GST</sup> nicht mehr optimiert werden, so dass weder eine Aufreinigung noch nachfolgende Experimente, wie die geplante elektrophysiologische Charakterisierung, durchgeführt werden konnten.

### 3.13 Identifikation und Lokalisation von TgSam50 in *Toxoplasma gondii*

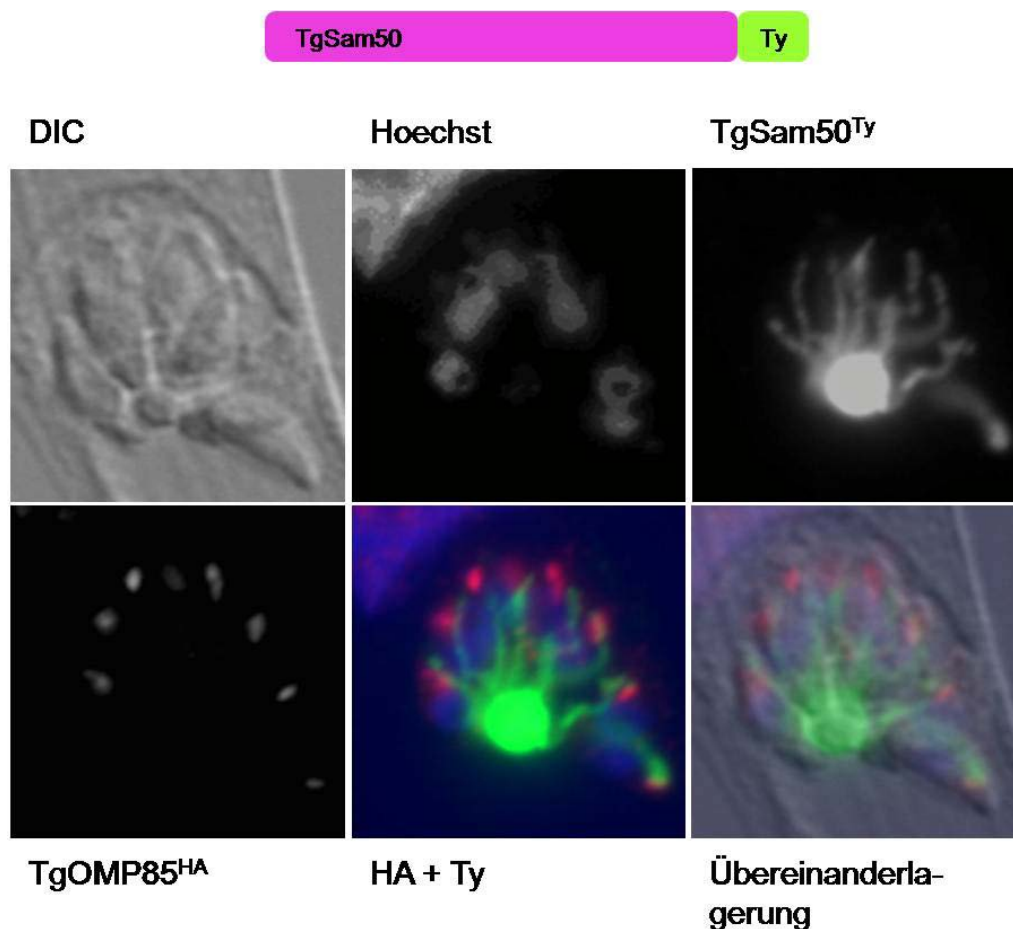
Neben den Proteinen des Toc75-Typs gibt es auch solche Proteine, die dem Sam50-Typ der OMP85-Familie angehören. Das identifizierte und in der vorliegenden Arbeit lokalisierte TgOMP85 weist eine Apikoplastenlokalisation auf und gehört daher vermutlich dem Toc75-Typ an. Von Bullmann durchgeführte bioinformatische Analysen implizierten die Existenz eines weiteren OMP85-Proteins in *T. gondii* (persönliche Mitteilung von Dr. Lars Bullmann). Dieses hypothetische Protein wird durch das Gen TGME49\_005570 kodiert und besitzt eine erwartete Masse von ca. 68 kDa. Um dieses Protein der OMP85-Familie in *T. gondii* nachzuweisen und seine Lokalisation zu bestimmen, wurde das Protein, welches von dem Gen TGME49\_005570 kodiert wird, an einen Ty-Tag fusioniert (Geneart), und das dafür kodierende Plasmid für Lokalisationsstudien in Tachyzoiten von *T. gondii* transfiziert.



**Abbildung 3-29: Lokalisation von TgSam50<sup>Ty</sup> im Mitochondrium von *T. gondii***

Durch eine fluoreszenzmikroskopische Analyse von TgSam50<sup>Ty</sup> und der Kolokalisation mit TgHSP60<sup>RFP</sup>, welches als mitochondrialer Marker fungierte, konnte ersterem eine Lokalisation im Mitochondrium von *T. gondii* zugewiesen werden.

Um eine mögliche Lokalisation des nun TgSam50<sup>Ty</sup> benannten Proteins im Mitochondrium von *T. gondii* analysieren zu können, wurde das Fusionsprotein mit dem RFP-markierten, mitochondrialen Markerprotein HSP60<sup>RFP</sup> (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Markus Meissner) kolokalisiert. Das Ergebnis dieser Lokalisationsstudie ist in Abbildung 3-29 dargestellt. Betrachtet man zunächst das Signal des mitochondrialen Markerproteins, so umgibt dieses die mit Höchst angefärbten Nuklei jedes einzelnen Parasiten. Vergleicht man hiermit das von TgSam50<sup>Ty</sup> stammende Signal, so ist eine deutliche Übereinstimmung bezüglich der Form und der Lokalisation beider Proteine zu erkennen. Dieser Befund deutet klar auf eine mitochondriale Lokalisation des TgSam50 Proteins hin. Um die mitochondriale Lokalisation von TgSam50<sup>Ty</sup> weiter zu bestätigen, und dieses Mitglied der OMP85-Familie gegen das bereits charakterisierte TgOMP85<sup>HA</sup> abzugrenzen, wurde eine weitere fluoreszenzmikroskopische Untersuchung durchgeführt, in welcher beide Proteine kolokalisiert wurden (Abbildung 3-30).



**Abbildung 3-30: Lokalisation von TgOMP85<sup>HA</sup> und TgSam50<sup>Ty</sup> in *T. gondii***

Um nachweisen zu können, dass beide identifizierten und lokalisierten OMP85-Proteine eine unterschiedliche subzelluläre Lokalisation aufweisen, wurde eine Kolokalisationsstudie durchgeführt. Wie dabei zu erkennen ist, nehmen beide dabei ihre eigene, dem jeweiligen Organell entsprechende Lokalisation innerhalb des Parasiten ein und befinden sich nicht innerhalb des gleichen Organells.

Wie die in Abbildung 3-30 dargestellten Daten zeigen, lässt sich die auf den Apikoplast beschränkte Lokalisation von TgOMP85<sup>HA</sup> klar von der mitochondrialen Lokalisation von TgSam50<sup>Ty</sup> unterscheiden. Somit konnte der Nachweis eines weiteren Proteins der OMP85-Familie in *T. gondii* erbracht werden und beide zwei verschiedenen Organellen (Apikoplast und Mitochondrium) zugeordnet werden.

#### 4 Diskussion

Parasiten, mit Ausnahme der *Cryptosporidien*, die dem Unterstamm der Apikomplexa angehören, zeichnen sich durch den Besitz einer sekundären Plastide aus, die als Apikoplast bezeichnet wird. Aufgrund des horizontalen Gentransfers zwischen dem Zellkern und der sekundären Plastide sind die meisten Proteine des Apikoplasten im Zellkern des Parasiten kodiert und müssen posttranslational in die Plastide importiert werden. Die Mehrheit dieser Proteine verfügt daher am N-Terminus über ein Signalpeptid, das kotranslational den Eintritt in das ER erlaubt (Rapoport, 2007). Darüber hinaus weisen sie ein weiteres Signal auf, welches man als Transitpeptid bezeichnet und den Weitertransport zum Apikoplasten auf bis dato ungeklärte Weise vermittelt (Waller *et al.*, 2000). Beide Sequenzen werden als sogenannte „Bipartite Topogenic Signal Sequence“ (BTS) zusammengefasst. Wie der Transportmechanismus im Detail aussieht, und welche Komponenten den Import über die vier Membranen der sekundären Plastide der Apikomplexa ermöglichen, ist Gegenstand zahlreicher aktueller Arbeiten. Einige Untersuchungen zum Proteintransport zwischen dem ER und der äußersten Apikoplastenmembran in *T. gondii* deuten darauf hin, dass dieser über Vesikel (Tonkin *et al.*, 2006) oder direkte Kontaktstellen ermöglicht werden könnte (Tomova *et al.*, 2009). Die Identifizierung und Lokalisierung der sogenannten „Symbiont-specific ERAD-like machinery“ (SELMA) in der Periplastid Membran der Chromalveolaten einschließlich der beiden Apikomplexa *P. falciparum* und *T. gondii* (Agrawal *et al.*, 2009; Hempel *et al.*, 2009; Spork *et al.*, 2009), und eines Tic-Homologs in der innersten Membran des Apikoplasten von *T. gondii* (van Dooren *et al.*, 2008) trugen im Wesentlichen zum Verständnis des Transportvorganges über die zweite und vierte Apikoplastenmembran bei. Dennoch ist nur wenig darüber bekannt, wie der Proteintransport über die dritte Apikoplastenmembran ermöglicht wird. Eine Antwort auf diese Frage könnte ein von Bullmann *et al.* (2010) im Genom von *P. falciparum* und *T. gondii* mittels bioinformatische Analysen identifiziertes Gen liefern, welches für ein Protein kodiert, das charakteristische Eigenschaften von Proteinen der OMP85-Familie aufzuweisen scheint. In der gleichen Arbeit wurde PtOMP85, ebenfalls ein Mitglied der OMP85-Familie, in der dritten Plastidenmembran der Diatomee *P. tricornutum* lokalisiert und erste Hinweise darauf geliefert, dass es sich dabei um ein Toc75-Homolog handeln könnte, welches als Translokator in der erwähnten Membran fungiert.

Zur Aufklärung des Transports über die dritte Apikoplastenmembran bei *T. gondii* sollte innerhalb der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob das von Bullmann *et al.* durch bioinformatische Analysen identifizierte OMP85-Protein, hier TgOMP85 genannt, tatsächlich im Apikoplasten von *T. gondii* lokalisiert ist und eine Komponente der dort vorhandenen Transportmaschinerie darstellen könnte.

### 4.1 Versuch der Lokalisation des endogenen TgOMP85

Durch Vergleichsanalysen von für OMP85-Proteinen typischen Domänen und Motive im Genmodell für das von Bullmann und Kollegen für *T. gondii* postulierte Protein konnte gezeigt werden, dass es sich bei TgOMP85 höchstwahrscheinlich um ein Mitglied der OMP85-Familie handelt (Abbildung 3-1). Nachfolgend sollte das endogene TgOMP85 mit Hilfe eines Antikörpers durch IFA in *T. gondii* lokalisiert werden. Wie man anhand der unter Abbildung 3-2 dargestellten Daten jedoch erkennen kann, verliefen diese Untersuchungen erfolglos. Betrachtet man zunächst die Resultate der IFA, so ist ein in der Peripherie des Parasiten gelegenes Signal zu erkennen. Anhand der Kolo-kalisation mit FNR wird deutlich, dass die eingesetzten Immunseren bzw. aufgereinigten Antikörper dabei kein Protein im Apikoplasten, sondern vermutlich Proteine in der Peripherie des Parasiten detektiert haben. Dies deutet auf eine Kreuzreaktion der verwendeten Immunseren und Antikörper mit anderen Parasitenproteinen hin. Da nach einem Sequenzvergleich (die analysierte Sequenz „EKRNEDAPHRKESQS“ wurde mittels BLAST-Analysen untersucht; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) keine weiteren Proteine von *T. gondii* identifiziert werden konnten, welche die Sequenz des Epitops enthalten, könnte die Kreuzreaktion auch auf eine konformationelle Ähnlichkeit zwischen den unspezifisch detektierten Proteinen und dem Epitop zurückzuführen sein. Des Weiteren könnte auch eine unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers denkbar sein.

Interessant erschienen im Vergleich dazu die Ergebnisse der Western-Blots, mit denen der proteinbiochemische Nachweis von TgOMP85 erfolgen sollte (Abbildung 3-3 und 3-4). Überraschenderweise konnte in diesen kein Protein im Totallysat der Parasiten detektiert werden. Dieses Ergebnis ist insofern überraschend, als dass die IFA eine Kreuzreaktion der Immunseren und des aufgereinigten Antikörpers mit Parasitenproteinen implizierte. Die einzige detektierte Bande fand sich jedoch im Lysat der nichtinfizierten Wirtszellen. Eine mögliche Erklärung, weshalb im Vergleich zu den IFA kein Signal in den Western-Blots detektiert wurde, könnte darin zu finden sein, dass die Proteine durch die Aufbereitung der Proben für die proteinbiochemischen Analysen entfaltet werden, während sie in der IFA durch Paraformaldehyd fixiert und im nativen Zustand vorliegen. Es lässt sich daher vermuten, dass eine Kreuzreaktion der Antiseren mit dem in *T. gondii* vorliegenden Protein abhängig von dessen Tertiärstruktur auftritt. Dies steht in Kongruenz zu den durchgeführten Sequenzvergleichen.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass eine Lokalisation des endogenen TgOMP85 mit den von Eurogentech bezogenen Immunseren und Antikörpern nicht möglich war, so dass in weiteren Versuchen andere Methodiken (wie z.B. das Taggen von

TgOMP85, Abbildung 3-5) angewendet wurden, um den Nachweis zur Existenz und eine Lokalisation des postulierten Proteins zu erbringen.

### 4.2 Der N-terminale Bereich von TgOMP85 enthält eine funktionelle BTS-Sequenz

Begründet durch die negativen Ergebnisse beim Versuch, das endogene TgOMP85 mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers in *T. gondii* zu lokalisieren, wurden alternativ Lokalisationsstudien von Ty- bzw. HA-markierten TgOMP85 durchgeführt. Diese Untersuchungen ergaben, dass beide Fusionsproteine im Apikoplasten von *T. gondii* vorzufinden sind (Abbildung 3-5 und 3-6). Mit diesen Resultaten wurde der Nachweis einer Lokalisation für TgOMP85 im Apikoplasten erbracht.

Daraufhin stellte sich die Frage, welche Sequenzen des Proteins die Lokalisation im Apikoplasten vermitteln. Da die meisten der Apikoplastenproteine an ihrem N-Terminus eine für den Transport verantwortliche BTS-Sequenz aufweisen, wurde überprüft, ob TgOMP85 ebenfalls solch eine BTS-Sequenz besitzt. Bioinformatische Vorhersagen deuteten lediglich auf ein Signalpeptid in den ersten 50 Aminosäuren von TgOMP85 hin (Abbildung 3-7), und der Einsatz weiterer Programme (wie z.B. PATS) führte zu keiner Identifikation einer eindeutigen BTS-Sequenz. Aus diesem Grund wurde eine dazu alternative Analysemethode genutzt. Da von Bullmann *et al.* (2010) bereits demonstriert wurde, dass die ersten 100 Aminosäuren von PtOMP85 eine Region mit hydrophiler Sequenz enthalten, welche die extra-stromale Lokalisation von PtOMP85 bedingt, wurden auch die ersten 100 Aminosäuren von TgOMP85 auf eine derartige Sequenz hin untersucht. Dazu wurden die ersten 100 Aminosäuren von TgOMP85 mit denen von PtOMP85 verglichen und mit Hilfe eines Hydropathie-Plots (Kyte & Doolittle, 1982) auf hydrophile Regionen hin überprüft (Abbildung 3-8). Bei genauem Vergleich der Hydropathie-Plots beider Proteine wird neben dem Unterschied bezüglich der Größe des Signalpeptids auch eine bedeutende Gemeinsamkeit offenbar. Diese Gemeinsamkeit besteht in einer ca. 10 Aminosäuren langen, hydrophilen Region. Da sich solch ein hydrophiler Bereich somit auch in TgOMP85 befindet, führte dies zu der Frage, ob dieser Bereich auch für TgOMP85 eine plastidäre, extra-stromale Lokalisation bedingt. Um dies zu analysieren, wurden Lokalisationsstudien mit zwei trunkierten TgOMP85 Proteinen (TgOMP85<sup>78-Ty</sup> und TgOMP85<sup>95-Ty</sup>) durchgeführt, welche den zuvor identifizierten, hydrophilen Abschnitt umfassten. Der Grund, weshalb neben TgOMP85<sup>78-Ty</sup> auch TgOMP85<sup>95-Ty</sup> auf seine Lokalisation hin überprüft wurde, war, sicherzustellen, dass man den für PtOMP85 beobachteten Abstand zwischen Signalpeptid und hydrophiler Region in dieser Relation auch bei TgOMP85 mitberücksichtigt und eine funktionelle, bei TgOMP85 möglicherweise gestreckte BTS-Sequenz nicht verfehlt. Dies

senkt die Gefahr falsch negativer Ergebnisse bezüglich der Identifikation einer möglichen BTS-Sequenz. Wie sich anhand der hierbei gewonnenen Ergebnisse erkennen lässt, wiesen beide Proteine bei den durchgeführten IFA eine Lokalisation innerhalb des Apikoplasten von *T. gondii* auf (Abbildung 3-9 und 3-10). Das deutet auf eine mögliche Bedeutung des hydrophilen Abschnitts bei der Lokalisation von TgOMP85 hin.

Zusammenfassend lässt sich somit aussagen, dass eine funktionelle BTS-Sequenz von TgOMP85, trotz negativer bioinformatischer Analysen, innerhalb der ersten 100 Aminosäuren liegt und wie die BTS-Sequenz von PtOMP85, für den Transport bzw. Lokalisation des Proteins verantwortlich ist.

Um die exakte Größe und Lage der Bestandteile der BTS-Sequenz bestimmen zu können, müssten in weiterführenden Experimenten weitere TgOMP85-Fragmente ebenfalls auf ihre Lokalisation hin überprüft werden. Eines dieser Fragmente sollte dabei die ersten 50 Aminosäuren und somit nur das vorhergesagte Signalpeptid enthalten. Dieses Protein sollte dann im Endoplasmatischen Retikulum und nicht im Apikoplasten vorzufinden sein. Für die Bestimmung der genauen Größe des Transitpeptids und somit der gesamten BTS-Sequenz müssten sukzessiv Aminosäuren an dieses vorhergesagte Signalpeptid angefügt und diese verlängerten TgOMP85-Fragmente bezüglich ihrer Lokalisation überprüft werden. Sobald eines dieser Proteine eine plastidäre Lokalisation aufweist, könnte daraus auf die exakte Größe der BTS-Sequenz von TgOMP85 geschlossen werden.

Nachdem beide Proteine (TgOMP85<sup>78-Ty</sup> und TgOMP85<sup>95-Ty</sup>) erfolgreich für den Nachweis einer funktionellen BTS-Sequenz von TgOMP85 eingesetzt werden konnten, sollte nun der Transportweg von TgOMP85 zu seinem Zielort näher untersucht werden. Da TgOMP85<sup>78-Ty</sup> und TgOMP85<sup>95-Ty</sup> bereits eine Lokalisation im Apikoplasten aufwiesen, war bei größeren bzw. längeren TgOMP85-Fragmenten davon auszugehen, dass diese ebenfalls im Apikoplasten lokalisiert sein würden. Um diese Annahme zu bestätigen, wurden Lokalisationsstudien an weiteren Ty-markierten TgOMP85-Fragmenten mit Hilfe von IFA durchgeführt. Diese Analysen zeigten, dass alle untersuchten TgOMP85-Fragmente (TgOMP85<sup>512-Ty</sup>, Abbildung 3-12A; TgOMP85<sup>790-Ty</sup>, Abbildung 3-12B) bis auf eine Ausnahme (TgOMP85<sup>277-Ty</sup>, Abbildung 3-11) in den Apikoplasten transportiert wurden. Wie die Immunfluoreszenzen hierzu zeigten, ist TgOMP85<sup>277-Ty</sup> möglicherweise im ER bzw. Golgi lokalisiert und wird daher nicht effektiv in den Apikoplasten transportiert. Dieses Resultat könnte in Anbetracht der vorangegangenen Ergebnisse gegen eine funktionelle BTS-Sequenz sprechen und steht sowohl im Gegensatz zu den für die kürzeren (TgOMP85<sup>78-Ty</sup> und TgOMP85<sup>95-Ty</sup>) als auch die längeren (TgOMP85<sup>512-Ty</sup>, TgOMP85<sup>790-Ty</sup>) TgOMP85-Fragmente erhaltenen Ergebnisse. Es wäre denkbar, dass eine Fehlfaltung von



TgOMP85<sup>277-Ty</sup> für den mangelhaften Transport dieses Proteins in die Plastide verantwortlich ist. Da die kürzeren TgOMP85-Fragmente eine Lokalisation im Apikoplasten zeigten, scheint es plausibel, dass die durch die Anwesenheit der Aminosäuren 96-277 bedingte Faltung des Proteins das eigentliche Zielsteuerungselement, welches in den kürzeren Fragmenten noch zugänglich war, maskierte und TgOMP85<sup>277-Ty</sup> so nicht mehr als Plastidenprotein identifiziert und transportiert werden konnte. In Kongruenz dazu konnte dieses Phänomen durch Addition weiterer Aminosäuren hin zum gesamten Protein wieder aufgehoben werden. Möglicherweise sind die zusätzlichen Aminosäuren für die korrekte Faltung des Proteins essentiell dafür verantwortlich, dass das Zielsteuerungselement wieder zugänglich und ordnungsgemäß erkannt wurde.

Zusammenfassend lässt sich somit aussagen, dass das von Bullmann *et al.* (2010) im Genom von *T. gondii* identifizierte TgOMP85 tatsächlich im Apikoplasten lokalisiert ist, und dass diese Lokalisation von einer funktionellen BTS-Sequenz vermittelt wird, die innerhalb der ersten 100 Aminosäuren des Proteins vorliegt.

### **4.3 Die Restriktionsenzym-vermittelte Integration von TgOMP85 in das Genom von *T. gondii* zur Herstellung von stabilen Parasitenlinien**

Durch die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen an verschiedenen TgOMP85 Fusionsproteinen konnte eine Lokalisation dieses Proteins im Apikoplasten nachgewiesen werden. Da die Konzentration des transformierten Plasmids bereits kurze Zeit nach Elektroporation unter die Nachweisgrenze sinkt (Kim *et al.*, 1993; Donald und Roos, 1993), sollte zum proteinbiochemischen Nachweis der im Apikoplasten lokalisierten Proteine und zur Überprüfung einer möglichen Membranassoziation stabile Parasitenlinien generiert werden, welche TgOMP85 beziehungsweise die trunkierten Varianten dieses Protein stabil exprimieren (Abschnitt 3.7). Darüber hinaus sollte anhand weiterer Western-Blots analysiert werden, ob sich eine für Apikoplastenproteine charakteristische Prozessierung (Abspaltung des Signal- und Transitpeptids) auch für TgOMP85 beobachten lässt.

Zur Generierung der stabilen Linien mussten die in *T. gondii* einzubringenden Plasmide linearisiert werden und die Ansätze zusätzlich das Restriktionsenzym *NotI* enthalten. Diese Methode ist als sogenannte „Restriktionsenzym-vermittelte Integration“ (Restriction enzyme mediated integration, REMI) bekannt und kann die Transfektions- / Transformationseffizienz um das 400-fache erhöhen (Black *et al.*, 1995). Durch die REMI kann das einzubringende Plasmid bzw. das Gen jedoch unkontrolliert an verschiedenen Stellen des Genoms integrieren (Black *et al.*, 1995; Gubbels *et al.*, 2004).

Da die erzeugten Western-Blots der scheinbar stabilen Parasitenlinien keine entsprechenden Banden für TgOMP85<sup>Ty</sup>, TgOMP85<sup>HA</sup> bzw. die TgOMP85-Fragmente aufwiesen (Abbildung 3-13 und 3-14), könnte die beschriebene zufällige Integration der Plasmide an Stellen des Genoms und die damit einhergehende geringfügige Expression als plausibler Erklärungsansatz fungieren. Ein ähnliches Phänomen wurde von Black *et al.* (1995) bereits bei einem Versuch, verschiedene Fragmente des „Surface Antigene 1“ (SAG1) Proteins stabil in *T. gondii* zu exprimieren, beobachtet. Dabei stellten die Autoren fest, dass die Expression der ins Genom von *T. gondii* integrierten Gene abhängig von der Integrationsstelle im Genom ist. Je nach Integrationsstelle wurde die Expression sogar inhibiert, so dass das entsprechende Protein im Western-Blot nicht zu detektieren gewesen ist.

Weitere mögliche Erklärungen dafür, weshalb die stabile Transfektion nicht erfolgreich verlief, könnten einerseits eine allgemein niedrige Transfektionseffizienz und andererseits die Zugänglichkeit der linearisierten Plasmide nach der Elektroporation für Exonukleasen sein (Sibley *et al.*, 1994). Ein weiterer Grund könnte auch darin zu finden sein, dass die zufällige Insertion des Gens in das Parasitengenom einen Frameshift erzeugte, so dass dies zu einer fehlerhaften Transkription und Translation des eingebrachten Gens führte. Darüber hinaus könnte die Integration auch zu einem Gene-Silencing geführt haben, einem Phänomen, das man bei stabilen Transformationen häufiger beobachtet. Dabei können die mit der integrierten DNA eingebrachten regulatorischen Elemente durch die chromosomale Umgebung an der Integrationsstelle negativ beeinflusst und das Gen so stummgeschaltet werden. Falls hingegen die Proteine einen toxischen Effekt auf die Parasiten ausgeübt haben sollten, so stellen die durch Selektion vermehrten Parasiten jene dar, bei denen die Integration zu einem Gene Silencing geführt hat. Denkbar wäre auch eine Kombination aus verschiedenen, der oben genannten Erklärungsansätzen wie geringer Transfektionseffizienz und einer Integration an weniger geeigneten Bereichen im Genom.

Für das Plasmid, welches das gesamte TgOMP85 Gen enthielt, ist eine homologe Rekombination mit dem endogenen Gen anzunehmen. Eine erfolgreiche homologe Rekombination sollte zudem keine negativen Auswirkungen auf den Parasiten haben. Der mit dem Plasmid gleichzeitig eingebrachte Ty- bzw. HA-Tag jedoch könnte für einen toxischen Effekt verantwortlich gewesen sein. Dieses Phänomen scheint trotz geringer Größe des Tags bei stabilen Transfektanten häufig aufzutreten (persönliche Mitteilung von Dr. Markus Meissner). Die Tatsache, dass parallel durchgeführte Transfektionen anderer Proteine, wie PTS2-mCherry (durchgeführt von Laura Thomas), zu positiven Klonen führten, während die Transfektionen von TgOMP85 und dessen Fragmenten negativ verliefen, könnten Hinweise auf einen solchen toxischen Effekt (im Fall von TgOMP85<sup>Ty</sup>) darstellen.

Um dies zu überprüfen, sollten in weiteren Versuchen der stabilen Transfektion von TgOMP85 andere Proteinmarkierungen (wie z.B. Myc-Tag) genutzt werden.

### 4.4 Versuch der intraorganellen Lokalisation von TgOMP85

Die Lokalisationsstudien von Ty- bzw. HA-markiertem TgOMP85 zeigten eindeutig, dass TgOMP85 im Apikoplasten von *T. gondii* vorzufinden ist. Dieses Ergebnis warf die Frage auf, ob TgOMP85, wie auch das PtOMP85 der Diatomee *P. tricornutum*, einen Bestandteil der dritten Membran der sekundären Plastide bildet. Erste Indizien für eine Lokalisation des Proteins in den äußeren Membranen des Apikoplasten ergaben sich aus den IFA für das Fragment TgOMP85<sup>512-Ty</sup> (Abbildung 3-12). Diese mögliche Lokalisation in den äußeren Membranen ließ sich durch Übereinstimmung der Pixelprofile von TgOMP85<sup>512-Ty</sup> und TgFtsH1-V5<sup>233</sup>-HA (Abbildung 3-16), einem Protein der Apikoplastenmembranen (Karnataki *et al.*, 2007), bestätigen.

Zur exakten Bestimmung der intraorganellen Lokalisation von TgOMP85 sollte in einem weiteren Experiment das Self-Assembling Split GFP-System (Cabantous und Waldo, 2006) eingesetzt werden. Um dieses System in unserem Labor für *T. gondii* zu etablieren, wurden die beiden GFP-Fragmente ( $\beta$ -Stränge 1-10 beziehungsweise  $\beta$ -Strang 11) zunächst einzeln an trunkierte Bereiche von TgCdc48ap beziehungsweise TgFNR fusioniert. Die Lokalisation dieser Proteine in einzelnen Subkompartimenten der sekundären Plastide von *P. falciparum* und *T. gondii* wurden unabhängig vom Self-Assembling Split GFP-System durch andere Gruppen bereits nachgewiesen (Agrawal *et al.*, 2009; Harb *et al.*, 2004; Spork *et al.*, 2009). Die Ergebnisse konnten für das Self-Assembling Split GFP-System innerhalb dieser Arbeit jedoch nicht reproduziert werden. Eine Erklärung hierzu liegt möglicherweise in der geringen Transfektionseffizienz für diese Konstrukte in *T. gondii* begründet. Ebenso denkbar ist, dass dieses System mit den genannten trunkierten Proteinen nicht kompatibel ist und die Fusionsproteine degradiert beziehungsweise generell nicht exprimiert wurden. Dies hatte zur Folge, dass die Frage nach der intraorganellen Lokalisation von TgOMP85 nicht aufgeklärt werden konnte. Der daraufhin unternommene Versuch, die genannten Kontrollen stabil in das Genom des Parasiten zu integrieren, um so eine höhere Effizienz der Expression zu erzielen, verlief ebenfalls erfolglos. Ein Grund für dieses negative Ergebnis könnte ein weiteres Mal in der zufällig erfolgten Integration der Plasmide (Black *et al.*, 1995) an ungeeigneten Stellen des Genoms zu finden sein, was wiederum eine zu geringe Expression der Proteine zu Folge hatte.

Alternativ könnten in weiteren Experimenten die einzelnen Self-Assembling Split GFP Fragmente jeweils an das volle Länge TgCdc48ap bzw. TgFNR fusioniert und mit Hilfe von

IFA analysiert werden. Die Lokalisation dieser bereits bekannten Proteine wäre notwendig, um das Funktionsprinzip des Self-Assembling Split GFP-System für *T. gondii* in unserem Labor zu belegen.

Die Durchführung einer Immuno-Elektronenmikroskopie an Tachyzoiten, welche transient mit für TgOMP85<sup>Ty</sup> bzw. TgOMP85<sup>HA</sup> kodierenden Plasmiden transfiziert wurden, stellt eine Alternative zu den Immunofluoreszenzmikroskopischen Methoden dar und könnte zur Aufklärung einer möglichen Lokalisation von TgOMP85 in den Membranen des Apikoplasten beitragen. Mit Hilfe von Goldpartikel-gekoppelten Primär- bzw. Sekundärantikörpern könnte eine Zuordnung zu den Membranen des Apikoplasten möglich werden. Um eine klare Aussage über eine vom Stroma distinkte Lokalisation von TgOMP85 treffen zu können, müsste bei Durchführung einer Immuno-Elektronenmikroskopie gleichzeitig ein Markerprotein für das Apikoplastenstroma, wie z.B. das FNR oder „AcyCarrier Protein“ (ACP), eingesetzt werden. Da mit Hilfe der Immuno-Elektronenmikroskopie bereits andere Proteine wie Der1ap und Tic20 erfolgreich in Membranen des Apikoplasten lokalisiert werden konnten (van Dooren *et al.*, 2008; Agrawal *et al.*, 2009), stellt dieser Ansatz eine geeignete Alternative dar, um TgOMP85 in einer der vier Apikoplastenmembranen bei *T. gondii* nachzuweisen.

Zusammenfassend lässt sich somit aussagen, dass zwar eine exakte Lokalisation von TgOMP85 in der Plastide nicht möglich war, es in dieser Arbeit jedoch gelang, durch eine Koloalisation von TgOMP85<sup>512-Ty</sup> mit einem Markerprotein der äußeren Plastidenmembranen (TgFtsH1-V5<sup>233</sup>-HA) und der Analyse des zugehörigen Pixelprofils eindeutige Indizien für eine Lokalisation von TgOMP85<sup>512-Ty</sup> in den äußeren Apikoplastenmembranen zu erbringen.

### 4.5 Stellt TgOMP85 ein für *Toxoplasma gondii* essentielles Protein dar?

*T. gondii* zeichnet sich durch ein haploides Genom aus. Diese Eigenschaft ermöglicht es, die Funktion einzelner Gene durch Deletion näher zu analysieren, da eine Veränderung des Genotyps direkt in einer Änderung des Phänotyps resultiert. Eine Deletion des „Gene of interest“ (GOI) kann durch doppelte homologe Rekombination eines Plasmids erfolgen, welches ein Resistenzgen enthält, das von der 5'- und 3'-UTR des GOI flankiert wird. Sollte das GOI für das Überleben des Parasiten essentiell sein, so äußert sich dessen Deletion aufgrund der Haploidie in einem langsameren Wachstum bis hin zum Absterben des Parasiten. Ausgehend von der Tatsache, dass die direkte Deletion eines essentiellen Gens für den Parasiten letal ist, sollte in der vorliegenden Arbeit zur Charakterisierung der

Funktion von TgOMP85 ein auf Tetrazyklin-Regulation basierendes System (Meissner *et al.*, 2002) angewendet werden, um das endogene TgOMP85-Gen auszutauschen (Abschnitt 3-10). Dafür sollte eine Parasitenlinie (TATi-Linie) hergestellt werden, in der das endogene TgOMP85-Gen durch ein Gen ersetzt wurde, welches für eine Chloramphenicol-Resistenzkassette kodiert. In diese Parasitenlinie, in der das endogene TgOMP85-Gen nun durch ein Gen zur Chloramphenicolresistenz ersetzt vorliegt, sollte in einem folgenden Schritt ein weiteres Plasmid, das für TgOMP85 kodiert, eingebracht werden, dessen Expression durch Zugabe von Tetrazyklin herabreguliert werden kann. Jedoch traten Probleme sowohl bei der stabilen Integration des TgOMP85-Gens in das Genom als auch bei der Detektion des Ty-getaggten TgOMP85 in transient transfizierten Parasiten auf, so dass es in dieser Arbeit nicht möglich war, das auf Regulation über Tetrazyklin basierende System erfolgreich zu etablieren. Somit konnten keine Daten zur möglichen Funktion von TgOMP85 gewonnen werden. Neben den bereits genannten, möglichen Gründen (geringe Transfektionseffizienz; zufällige Integration des Plasmids an Stellen des Parasitengenoms mit niedriger Expressionsrate bzw. Inhibition der Expression) konnten für dieses negative Ergebnis keine weiteren Gründe für das Scheitern gefunden werden.

Für weitere Analysen zur Klärung der Frage, ob TgOMP85 eine für den Parasiten essentielle Funktion hat, könnte eine direkte Deletion des endogenen TgOMP85 Gens durch doppelte homologe Rekombination versucht werden. Handelt es sich bei TgOMP85 um ein essentielles Protein, so würde die Deletion des Gens zum langsameren Wachstum oder zum Absterben der Parasiten führen. Dies würde ein Indiz für die essentielle Funktion darstellen. Darüber hinaus könnte die Funktionalität von TgOMP85 auch dadurch analysiert werden, indem der Promotor des endogenen Gens durch einen Tetrazyklin oder andersweitig regulierbaren Promotor ersetzt wird. Diese Methode würde im Wesentlichen auf dem bereits erläuterten System basieren, jedoch würde in dieser alternativen Vorgehensweise nicht das gesamte GOI ersetzt werden, sondern lediglich der dazu gehörende endogene Promotor. Eine derartige Strategie konnte für das „Peripheral Plastid Protein“ (PPP1) im Apikoplasten von *T. gondii* angewendet werden, um dessen Funktion und dessen Wichtigkeit für die Biogenese des Apikoplasten zu analysieren (Sheiner *et al.*, 2011).

Eine weitere Alternative zu den oben genannten Ansätzen besteht in der Anwendung von dominant negativen Mutanten. Dazu müsste TgOMP85, welches in diesem Fall von einem externen Plasmid kodiert wird, an eine destabilisierende Domäne (ddFKBP) fusioniert werden, welche es möglich macht, die Stabilität des Proteins derart zu modulieren, dass TgOMP85 dem proteasomalen Abbau zugeführt wird. Die ddFKBP Domäne kann in Anwesenheit eines synthetischen Liganden, Shield 1, selektiv stabilisiert werden, wodurch die Degradation des Fusionsproteins unterbunden wird (Herm-Götz *et al.*, 2007; Striepen,

2007). Durch dieses Verfahren kann die tatsächlich im Parasiten vorhandene Proteinmenge reguliert und eine mögliche Funktion des Proteins direkt untersucht werden. Ein weiterer Vorteil ist, dass bei dieser Methode nicht langwierig die Expression reguliert und ein möglicher Effekt auf den Phänotypen erst nach längerer Zeit offenbar wird, sondern die Proteinmenge direkt und quasi stufenlos reguliert werden kann. Jedoch ist an dieser Stelle zu erwähnen, dass es bis dato noch keine Daten dies bezüglich existieren, die eine Anwendbarkeit dieses System für sekretierte Proteine belegen.

### 4.6 Versuch der Aufreinigung von TgOMP85<sup>91-259His</sup>

Die IFA, bei denen das endogene TgOMP85 mit Hilfe von spezifisch gegen dieses Protein generierten Antiseren der Firma Eurogentec in *T. gondii* lokalisiert werden sollten, führten zu negativen Ergebnissen (Abbildung 3-2). Daher sollte das Protein in einem anderen Ansatz mit einem weiteren Antikörper detektiert werden.

Hierzu wurde ein entsprechendes Polypeptid rekombinant exprimiert, um es für eine Immunisierung von Kaninchen zu verwenden. Zu diesem Zweck wurde ein Fragment von TgOMP85, welches den Aminosäuren 91 bis 259 entspricht (TgOMP85<sup>91-259His</sup>), mit einem 6x Histidin-Tag fusioniert, rekombinant in *E. coli* exprimiert und anschließend versucht, dieses aufzureinigen. Der Grund für die Wahl dieses Bereichs von TgOMP85 besteht darin, dass TgOMP85<sup>91-259His</sup> Teil des muren TgOMP85 sein sollte und daher voraussichtlich keinerlei Prozessierung, wie das Abspalten des SP und TP, erfährt. Trotz Einsatz verschiedener Methoden zur Separierung des rekombinant exprimierten Proteins von bakteriellen Proteinen gelang es nicht, TgOMP85<sup>91-259His</sup> in ausreichender Menge bzw. Reinheit zu gewinnen. Eine konstant auftretende Kontaminante war dabei das aus *E. coli* stammende Protein SlyD. Dabei handelt es sich um eine Peptidyl Prolyl cis/trans-Isomerase, welche an ihrem N-Terminus eine Domäne mit Chaperonaktivität aufweist und deren C-Terminus reich an Histidin- und Cystein-Resten ist (Robichon *et al.*, 2011). SlyD weist daher, wie auch der His-Tag selbst, eine hohe Affinität zu divalenten Ionen wie Ni<sup>2+</sup> und Zn<sup>2+</sup> auf (Wulfig *et al.*, 1994) und stellt deshalb eine der Hauptkontaminanten bei Aufreinigungen von Proteinen mit Ni-NTA Agarose dar (Parsy *et al.*, 2007). SlyD trägt bei neutralem pH eine Ladung von -23, während TgOMP85<sup>91-259His</sup> eine Ladung von +10 aufweist. Basierend auf dieser Eigenschaft sollte SlyD daher durch eine Ionenaustauschchromatographie und eine Interaktion mit dem positiv geladenen Säulenmaterial aus der Probe entfernt werden können. Der Versuch, SlyD durch eine Ionenaustauschchromatographie von dem aufzureinigenden TgOMP85<sup>91-259His</sup> zu trennen, blieb unerwarteterweise erfolglos. Grund für dieses Phänomen könnte die Chaperonfunktion von SlyD sein, welche zu einer Interaktion zwischen diesem Protein und

dem aufzureinigenden Peptid führen könnte. Als Konsequenz dieses Problems konnte kein Peptid zur Synthese des Antikörpers gewonnen werden und die Lokalisation des endogenen TgOMP85 Proteins steht weiterhin aus.

Die hohe Affinität von SlyD zu divalenten Ionen erschwert Versuchsansätze, die auf Histidin-Tags beruhen. Alternativ sollten daher Aufreinigungsmethoden beziehungsweise Proteinmarkierungen getestet werden, bei denen keinerlei divalente Ionen, wie  $\text{Ni}^{2+}$  bzw.  $\text{Zn}^{2+}$ , eingesetzt werden. Als alternative Tags könnten beispielsweise Glutathion S-Transferase (GST) oder das Maltose bindende Protein (MBP) dienen. Falls der Einsatz alternativer Proteinmarkierungen nicht möglich sein sollte, bestünde eine weitere Möglichkeit zur Aufreinigung von Histidin-markiertem TgOMP85 in einer Expression des jeweiligen Proteins in den von Robichon *et al.* (2011) entwickelten *E. coli* BL21 (DE3) Derivatstämmen NiCo21 und NiCo22. Beide Stämme sind speziell zu Aufreinigungszwecken von Histidin markierten Proteinen entwickelt worden und zeichnen sich dadurch aus, dass sie die bei Aufreinigung dieser Proteine häufig auftretenden Kontaminanten, unter ihnen auch SlyD, mit einer sogenannten Chitin bindenden Domäne (CBD) exprimieren. Durch den Einsatz von Chitin Magnetic Beads, an welche die CBD-enthaltenden Kontaminanten binden können, und eines Magneten können die unerwünschten Proteine vor der eigentlichen Aufreinigung des Histidin markierten Proteins weitestgehend eliminiert werden. Über eine solche, kombinierte Aufreinigungsmethode könnte ein ausreichend hoher Reinheitsgrad des aufzureinigenden Peptids für die nachfolgende Immunisierung erzielt werden. Falls auch diese Aufreinigungsmethode zu keiner reinen TgOMP85<sup>91-259His</sup> Fraktion führen sollte, so könnte die bereits oben angedeutete, möglicherweise auf der Chaperonfunktion von SlyD beruhende Interaktion zwischen dem aufzureinigenden Peptid und der Kontaminante ein Grund für dieses Phänomen sein.

Um diesem Problem vorzubeugen und die mögliche Interaktion zwischen beiden Proteinen zu verhindern, könnte statt eines Fragments das vollständige TgOMP85 versucht werden aufzureinigen, da di es in manchen Fällen eine Interaktion zwischen Peptid und Kontaminante erschwert (persönliche Beobachtung von Frank Lennartz). Dazu wurde in einem vorläufigen Expriment versucht, das vollständige TgOMP85 an GST zu fusionieren und in *E. coli* zu exprimieren. Wie man anhand der Abbildung 3-28 jedoch erkennen kann, wurde TgOMP85<sup>GST</sup> offensichtlich nicht exprimiert. Da aber die Expression von reinem GST erfolgreich war, könnte dieses Ergebnis implizieren, dass nur die Expression des Fusionsproteins erschwert ist. Um Probleme bei der Expression von TgOMP85<sup>GST</sup> zu lösen, müssten die Expressionsbedingungen optimiert werden. Dazu könnten sowohl unterschiedliche Temperaturen getestet als auch die IPTG-Konzentration variiert werden. Darüber hinaus besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass TgOMP85<sup>GST</sup> toxisch für die

exprimierenden Bakterien ist. In diesem Fall könnte der GST-Tag gegen beispielsweise einen MBP-Tag ausgetauscht und getestet werden.

### **4.7 Die Identifizierung eines weiteren OMP85-Proteins im Mitochondrium von *T. gondii***

Mitglieder der OMP85-Familie findet man in den äußeren Membranen von gram-negativen Bakterien, Mitochondrien und Chloroplasten. Sie zeichnen sich durch zwei wichtige Domänen aus. Eine dieser Domänen befindet sich am N-Terminus, die sogenannte POTRA-Domäne, wohin gegen die zweite Domäne, ein  $\beta$ -Barrel, über welches das OMP85-Protein in die Membran integriert wird, am C-Terminus lokalisiert ist (Gentle *et al.*, 2005). Während die OMP85 Mitglieder in Plastiden (Toc75) größtenteils in den Proteintransport involviert sind (Sommer *et al.*, 2011), sind die der Bakterien (wie z.B. YaeT und BamA) und Mitochondrien (Sam50/Tob55) an der Assemblierung der äußeren Membran (Genevrois *et al.*, 2003) beteiligt und stellen somit wichtige Komponenten der Proteininsertionsmaschinerie dar (Gentle *et al.*, 2004). Im Falle von Sam50, das im Vergleich zu BamA nur eine POTRA-Domäne besitzt (Sommer *et al.*, 2011), besteht dessen Funktion während der Proteininsertion darin, gemeinsam mit den peripheren Proteinen Sam37 und Sam35 andere mitochondriale OMP-Proteine nach ihrer Passage über die äußere Membran im Intermembranraum zu erkennen und deren Integration und Assemblierung in die äußere Mitochondrienmembran zu vermitteln (Becker *et al.*, 2009; Sommer *et al.*, 2011).

Neben dem TgOMP85 konnte durch eine weitere von Bullmann durchgeführte bioinformatische Analyse zusätzlich ein Gen für ein weiteres Protein der OMP85-Familie (hier bezeichnet als TgSam50) im Genom von *T. gondii* identifiziert werden. Mit Hilfe von IFA von Parasiten, welche ein Ty-markiertes TgSam50 und ein Mitochondrienmarkerprotein (Hitzeschockprotein 60, gekoppelt an RFP) exprimierten, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass das zweite identifizierte OMP85-Protein im Gegensatz zu TgOMP85 eine Lokalisation im Mitochondrium des apikomplexen Parasiten aufweist (Abbildung 3-29). Aufgrund der mitochondrialen Lokalisation liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei diesem OMP85-Protein um ein Protein des Sam50-Subtyps handelt. Da zu TgSam50 aus zeitlichen Gründen bislang nur initiale Lokalisationsanalysen durchgeführt werden konnten, bleiben weitere Fragen zunächst ungeklärt. Es ist in Zukunft wichtig aufzuklären, ob es sich bei TgSam50 tatsächlich um ein Protein der OMP85-Familie handelt, welches an der Integration von Proteinen in die mitochondrialen Membranen beteiligt sein könnte. Um einen Aufschluss zur Funktionalität von TgSam50 zu erhalten, könnten neben Knock-out Strategien Versuche zur Bestimmung einiger Eigenschaften (wie z.B. die Ionenselektivität



und der Durchmesser des Proteins) durchgeführt werden, um Rückschlüsse auf die Proteinfunktion zu ziehen und TgSam50 einem der beiden OMP85 Subtypen zuzuordnen.

### 4.8 Ausblick

Der Apikoplast von *T. gondii* stellt ein Organell dar, in welchem viele der für den Parasiten wichtigen Stoffwechselwege, wie die Fettsäure- beziehungsweise Isoprenoidsynthese ablaufen. Aufgrund seines prokaryotischen Ursprungs unterscheiden sich die plastidären Stoffwechselwege von denen, die in eukaryotischen Zellen vorzufinden sind. Daher stellen der Apikoplast und seine Bestandteile ein ausgezeichnetes „Drug Target“ dar. Neben den Stoffwechselwegen könnten die einzelnen Schritte des Proteintransports zur sekundären Plastide als Zielobjekte für Therapeutika dienen. Voraussetzung dafür ist die Identifizierung der jeweiligen am Proteinimport beteiligten Komponenten.

Beispiele für mögliche Angriffspunkte von Medikamenten während des Proteintransports sind die „Symbiont ERAD like machinery“ (SELMA) in der periplastidären Membran und die Tic-Homologe der innersten Apikoplastenmembran. Als ein weiteres, mögliches Zielobjekt könnte das in dieser Arbeit analysierte TgOMP85 fungieren, vorausgesetzt weiterführende Experimente können ihm eine Funktion innerhalb der Proteintransportmaschinerie zuordnen. Im Rahmen dieser Arbeit konnten in *T. gondii* zwei von Bullmann *et al.* (2010) postulierte Proteine der OMP85-Familie im Parasiten nachgewiesen und lokalisiert werden. Während TgSam50 dabei eine Lokalisation im Mitochondrium aufweist, ist TgOMP85 im Apikoplasten vorzufinden. Weitere Analysen zur eindeutigen Zuordnung von TgOMP85 und TgSam50 zu den Toc-75 bzw. Sam50 Subtypen der OMP85-Proteinfamilie würden die erfolgreiche heterologe Expression, Aufreinigung und Integration der Proteine in Proteoliposomen bzw. artifizielle Membranen voraussetzen. Dies ermöglicht in Folge die Bestimmung der elektrophysiologischen Eigenschaften und die Berechnung der Porendurchmesser von TgOMP85 und TgSam50, aus denen Hinweise für die Funktionen beider Proteine erschlossen werden könnten. Des Weiteren könnte in Ergänzung dazu eine computergestützte Modellierung von TgOMP85 und TgSam50 Aufschluss über den Aufbau der Proteine beziehungsweise deren Funktionalität und die hierzu wichtigen Domänen geben.

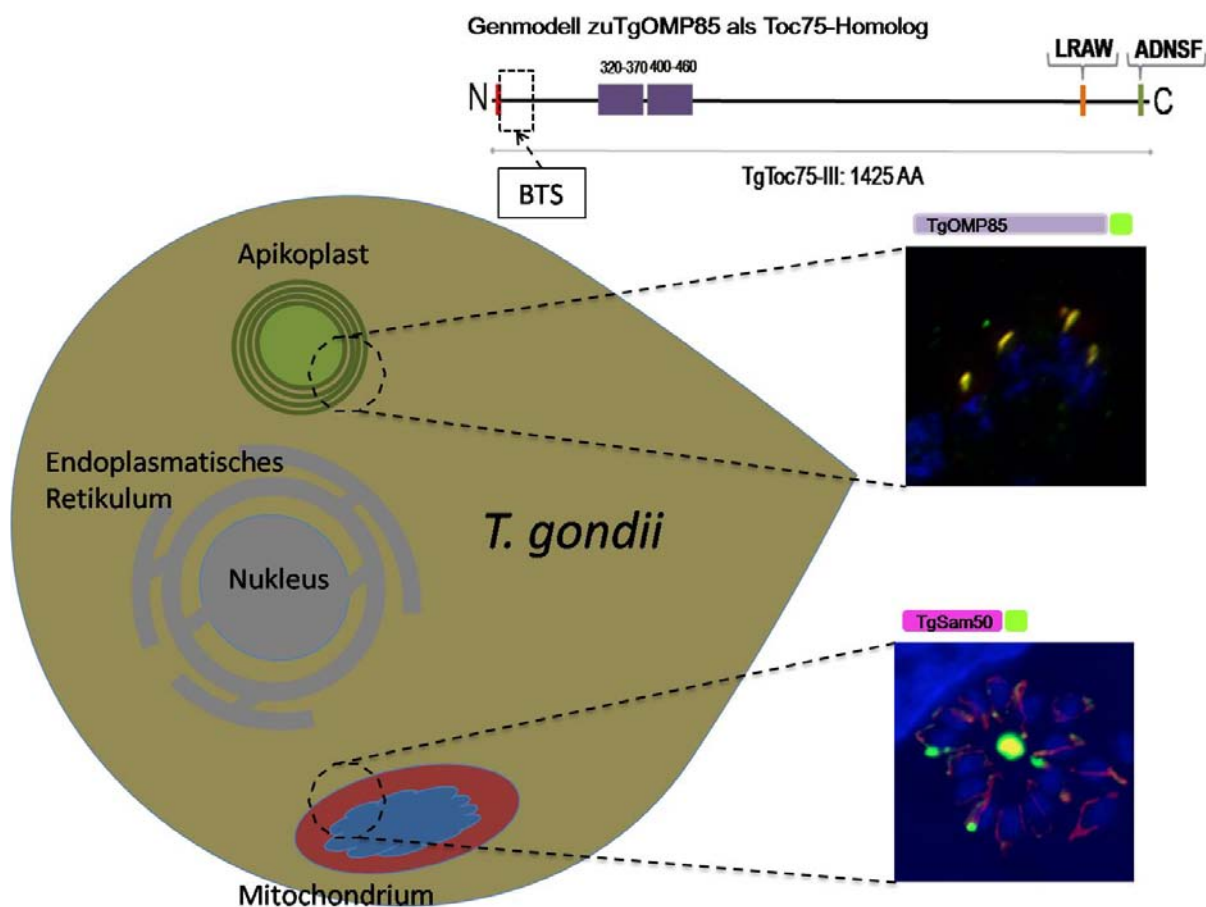
Darüber hinaus ist es notwendig, die genaue Lokalisation von TgOMP85 beziehungsweise TgSam50 in den Membranen des jeweiligen Organells aufzuklären. Für TgOMP85 könnte dies Aufschluss darüber geben, ob dieses Protein tatsächlich eine Komponente der Proteinimportmaschinerie in der dritten Apikoplastenmembran darstellt. Da der Apikoplast eine Größe von nur ca. 600 nm aufweist (Köhler, 2005) und eine genaue Differenzierung

zwischen den vier Membranen mit Hilfe fluoreszenzmikroskopischer Techniken daher nicht möglich zu sein scheint, sollte zudem eine Lokalisationsstudie von TgOMP85 mit Hilfe von Immuno-Elektronenmikroskopie durchgeführt werden. Diese Methode, mit der van Dooren *et al.* (2008) ein Tic-Homolog in der innersten Apikoplastenmembran von *T. gondii* nachgewiesen haben, könnte ebenfalls dazu beitragen, eine Aussage über die genaue Lokalisation und Funktion von TgOMP85 treffen zu können. Eine Alternative bzw. Ergänzung hierzu bietet die von Tomova *et al.* (2009) zur Analyse des Apikoplasten eingesetzte Elektronentomographie, mit der man die intraorganelle Lokalisation drei dimensional bestimmen könnte.

Geht man davon aus, dass TgOMP85 eine Komponente der Proteinimportmaschinerie des Apikoplasten darstellt, und es sich bei diesem Protein tatsächlich um ein Toc75-Homolog handelt, so sollte es, wie Toc75 es als Teil des Toc-Komplexes tut, mit anderen Proteinen interagieren. Toc75 bildet mit Toc34 und Toc159 einen Teil des Toc-Komplexes in Chloroplasten (Jarvis 2008). Daher sollte in der Folge eine Charakterisierung jener Interaktionspartner von TgOMP85 erfolgen. Mit Hilfe nativer Gelelektrophoresemethoden, wie beispielsweise der „Blue native“-Gelelektrophorese, könnten mögliche Interaktionspartner von TgOMP85 zunächst isoliert und anschließend mit Hilfe einer massenspektrometrischen Analyse identifiziert werden. Alternativ könnte mit Hilfe eines für TgOMP85 spezifischen Antikörpers eine Ko-Immunopräzipitation durchgeführt werden, mit der interagierende Proteine zusammen mit TgOMP85 isoliert werden können. Ebenso denkbar wären Pulldown-Versuche, bei dem rekombinantes, durch einen Tag markiertes TgOMP85 immobilisiert wird und als Köder für interagierende Proteine fungiert. Durch die Inkubation eines solchen TgOMP85-Fusionsproteins mit einem Totallysat von *T. gondii* könnten dabei mögliche Interaktionspartner an das immobilisierte TgOMP85 binden und im Anschluss mittels Massenspektrometrie identifiziert werden. Diese Technik hat zudem den Vorteil, dass eine Interaktion der Proteine nachgewiesen wird. Eine weitere Möglichkeit zur Isolierung von Interaktionspartnern besteht in sogenannten *in vivo* Crosslinkversuchen. Dabei werden chemische Agenzien, sogenannte Crosslinker eingesetzt, die an bestimmte Gruppen von Proteinen binden können und räumlich dicht nebeneinander liegende Moleküle miteinander quervernetzen. Durch den Einsatz von Crosslinkern definierter Länge könnten mögliche Interaktionspartner kovalent an TgOMP85 gebunden werden und nach erfolgter Gelelektrophoretischer Auftrennung mit Hilfe von MALDI-TOF identifiziert werden.

#### 4.9 Schlussbetrachtung

Betrachtet man rückblickend die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse, so lässt sich festhalten, dass mit Hilfe der bioinformatischen Analysen von Bullmann und Kollegen zwei Proteine (TgOMP85 und TgSam50) der OMP85-Familie in *T. gondii* nachgewiesen werden konnten. Während TgOMP85 eine Lokalisation im Apikoplasten aufweist, ist TgSam50 im Mitochondrium des Parasiten vorzufinden.



#### Abbildung 4-1: Zusammenfassung

Mit Hilfe der in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse konnten erstmals zwei Proteine der OMP85-Familie (hier als TgOMP85 und TgSam50 bezeichnet) im Apikoplasten beziehungsweise Mitochondrium von *T. gondii* nachgewiesen und lokalisiert werden. Basierend auf Homologien bezüglich des Genmodells und der Lokalisation, wird für TgOMP85 eine Toc75-Funktion postuliert. Zusätzlich wurde in TgOMP85 eine funktionelle BTS-Sequenz identifiziert.

Basierend auf den Ergebnissen der Lokalisationsstudien und den Homologien zu anderen Mitgliedern der OMP85-Familie kann für TgOMP85 davon ausgegangen werden, dass es wie PtOMP85 in der Diatomee *P. tricornutum* in den Proteinimports in die sekundäre Plastide involviert sein könnte. Darüber hinaus konnten mittels bioinformatischer Analysen und

Lokalisationsstudien von TgOMP85-Fragmenten gezeigt werden, dass der Transport bzw. die Lokalisation von TgOMP85 mit einer funktionellen BTS-Sequenz, die in den ersten 100 Aminosäuren des Proteins vorzufinden ist, vermittelt wird. Alle Ergebnisse liefern Grundlagen für weitere Untersuchungen am Proteintransport in Organellen innerhalb von *Toxoplasma gondii*, um die genaue Funktion dieser Proteine und den zugrundeliegenden Importmechanismus aufzuklären. Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse sind in Abbildung 4-1 nochmals zusammengefasst.

### 5a Zusammenfassung

Der intrazelluläre Parasit *Toxoplasma gondii* zeichnet sich wie die meisten Mitglieder der Chromalveolaten durch den Besitz einer sekundären Plastide aus, die man als Apikoplasten bezeichnet. Diese Art von Plastide ist durch einen Vorgang der sekundären Endosymbiose entstanden, bei der ein Rhodophyt von einer eukaryotischen Zelle aufgenommen und im Laufe der Evolution als Organell etabliert wurde. Aufgrund des horizontalen Gentransfers zwischen dem Nukleus und der Plastide werden die meisten Proteine des Apikoplasten im Wirtsgenom kodiert und im ER synthetisiert. Proteine des Apikoplastenstromas müssen daher aus dem ER, über die insgesamt vier Membranen der Plastide mit Hilfe einer Proteinimportmaschinerie zu ihrem Bestimmungsort befördert werden. Wie dieser Import im Detail erfolgt, ist zum jetzigen Zeitpunkt noch unklar. Jedoch konnten einige Komponenten dieser Maschinerie, wie SELMA in der PPM und ein Tic20-Homolog in der innersten Membran des Apikoplasten identifiziert werden.

Basierend auf bioinformatischen Analysen konnten zwei Proteine der OMP85-Familie im Genom von *T. gondii* identifiziert werden. Die Mitglieder dieser Familie können aufgrund ihrer Funktionalität zwei Subtypen (Toc75- und Sam50-Subtyp) zugeordnet werden. Während Proteine des Toc75-Subtyps am Transport von Proteinen über Membranen beteiligt sind, sind die des Sam50-Subtyps in der Integration von Proteinen in Membranen involviert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde für eines der beiden in *T. gondii* identifizierten OMP85 Proteine (TgOMP85) eine Funktion im Proteinimport in die Plastide postuliert. Nach Überprüfung des Genmodells konnte TgOMP85 eindeutig der OMP85-Familie zugeordnet und in den Apikoplasten des genannten Parasiten lokalisiert werden. Des Weiteren wurde der Nachweis erbracht, dass TgOMP85 eine funktionelle BTS-Sequenz aufweist, welche den Transport und die Lokalisation in den Apikoplasten vermittelt. Um die Vermutung, dass es sich bei TgOMP85 um eine, in der dritten Apikoplastenmembran lokalisierte, Komponente der Proteinimportmaschinerie handelt, bestätigen zu können, sind weiterführende Analysen nötig.

Das zweite identifizierte Protein (TgSam50) könnte aufgrund seiner Gensequenz und mitochondrialen Lokalisation dem Sam50-Subtyp zugeordnet werden. Ob es jedoch tatsächlich an der Assemblierung und Integration von Proteinen in die äußere mitochondriale Membran involviert ist, kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht beantwortet werden.

### 5b Summary

As with many members of the Chromalveolates, the intracellular parasite *Toxoplasma gondii* harbors a plastid which is called the apicoplast. This kind of plastid has been evolved by secondary endosymbiosis, an event in which a rhodophyte was engulfed by another eukaryotic cell. During the course of evolution, the endosymbiont became established as an organelle. Due to the horizontal gene transfer between the host nucleus and the secondary plastid most of the apicoplast proteins are encoded in the host nucleus, synthesized in the ER and therefore must be reimported into the plastid. Since the apicoplast features four membranes, proteins destined for the plastid stroma have to traverse them by using a protein import machinery. Even though some components of this machinery, SELMA in the PPM and a Tic20-homologue in the innermost apicoplast membrane, have been identified, the details of the import mechanism are still unknown.

Based upon bioinformatic analyses, two proteins of the OMP85-family were identified in the genome of *T. gondii*. Depending on their function proteins of this family can be divided further into two subgroups. Proteins of Toc75-subtype are involved in protein transport whereas members of Sam50-subtype are characterized as components of protein insertion and assembly machineries. During the course of this work one protein of the OMP85-family (TgOMP85) could be localized in the apicoplast of the parasite. After a verification of the gene model TgOMP85 can definitely be assigned to the OMP85-family. Furthermore like most of the apicoplast proteins it possesses a functional BTS-sequence at its N-terminus, which is responsible for targeting the protein to the plastid. In order to verify if TgOMP85 represents a component of the protein import machinery in the third apicoplast membrane, further analysis has to be carried out.

The second identified protein in the apicomplexan parasite was localized in the mitochondrion and is designated as TgSam50. Due to its gene sequence and its localization this protein can be assigned to the Sam50-subtype of the OMP85-family. Whether TgSam50 is in fact involved in the integration events of proteins into the outer mitochondrial membrane remains to be clarified.

**6 Literatur**

**Abrahamsen MS, Templeton TJ, Enomoto S, Abrahante JE, Zhu G, Lancto CA, Deng M, Liu C, Widmer G, Tzipori S, Buck GA, Xu P, Bankier AT, Dear PH, Konfortov BA, Spriggs HF, Iyer L, Anantharaman V, Aravind L, Kapur V.** (2004). Complete genome sequence of the apicomplexan, *Cryptosporidium parvum*. *Science*. 304(5669):441-5.

**Agrawal S, van Dooren GG, Beatty WL, Striepen B.** (2009). Genetic evidence that an endosymbiont-derived endoplasmic reticulum-associated protein degradation (ERAD) system functions in import of apicoplast proteins. *J Biol Chem*. 284(48):33683-91.

**Agrawal S, Striepen B.** (2010). More membranes, more proteins: complex protein import mechanisms into secondary plastids. *Protist*. 161(5):672-87.

**Akita M, Nielsen E, Keegstra K.** (1997). Identification of protein transport complexes in the chloroplastic envelope membranes via chemical cross-linking. *J Cell Biol*. 136(5):983-94.

**Apt KE, Zaslavkaia L, Lippmeier JC, Lang M, Kilian O, Wetherbee R, Grossman AR, Kroth PG.** (2002). In vivo characterization of diatom multipartite plastid targeting signals. *J Cell Sci*. 115(Pt 21):4061-9.

**Archibald JM.** (2008). Plastid evolution: remnant algal genes in ciliates. *Curr Biol*. 18(15):R663-R665.

**Arnold T, Zeth K, Linke D.** (2010). Omp85 from the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* differs from proteobacterial Omp85 in structure and domain composition. *J Biol Chem*. 285(23):18003-15.

**Becker T, Gebert M, Pfanner N, van der Laan M.** (2009). Biogenesis of mitochondrial membrane proteins. *Curr Opin Cell Biol*. 21(4):484-93.

**Bédard J, Jarvis P.** (2005). Recognition and envelope translocation of chloroplast preproteins. *J Exp Bot*. 56(419):2287-320.

**Bhaya D, Grossman A.** (1991). Targeting proteins to diatom plastids involves transport through an endoplasmic reticulum. *Mol Gen Genet*. 229(3):400-4.

**Black M, Seeber F, Soldati D, Kim K, Boothroyd JC.** (1995). Restriction enzyme-mediated integration elevates transformation frequency and enables co-transfection of *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol*. 74(1):55-63.

**Black MW, Boothroyd JC.** (2000). Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiol Mol Biol*. 64(3):607-23.

**Bolte K, Bullmann L, Hempel F, Bozarth A, Zauner S, Maier UG.** (2009). Protein targeting into secondary plastids. *J Eukaryot Microbiol*. 56(1):9-15.

**Boothroyd JC, Dubremetz JF.** (2008). Kiss and spit: the dual roles of *Toxoplasma* rhoptries. *Nat Rev Microbiol*. 6(1):79-88.

- Bos MP, Robert V, Tommassen J.** (2007). Functioning of outer membrane protein assembly factor Omp85 requires a single POTRA domain. *EMBO Rep.* (12):1149-54.
- Bos MP, Robert V, Tommassen J.** (2007). Biogenesis of the gram-negative bacterial outer membrane. *Annu Rev Microbiol.* 61:191-214.
- Bölter B, Soll J, Schulz A, Hinnah S, Wagner R.** (1998). Origin of a chloroplast protein importer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(26):15831-6.
- Bredemeier R, Schlegel T, Ertel F, Vojta A, Borissenko L, Bohnsack MT, Groll M, von Haeseler A, Schleiff E.** (2007). Functional and phylogenetic properties of the pore-forming beta-barrel transporters of the Omp85 family. *J Biol Chem.* 282(3):1882-90.
- Bullmann L, Haarmann R, Mirus O, Bredemeier R, Hempel F, Maier UG, Schleiff E.** (2010). Filling the gap, evolutionarily conserved Omp85 in plastids of chromalveolates. *J Biol Chem.* 285(9):6848-56.
- Cabantous S, Waldo GS.** (2006). In vivo and in vitro protein solubility assays using split GFP. *Nat Methods.* 3(10):845-54.
- Carrillo N, Ceccarelli EA.** (2003). Open questions in ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductase catalytic mechanism. *Eur J Biochem.* 270(9):1900-15.
- Carruthers VB, Sibley LD.** (1997). Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. *Eur J Cell Biol.* 73(2):114-23.
- Carruthers VB, Sibley LD.** (1999). Mobilization of intracellular calcium stimulates microneme discharge in *Toxoplasma gondii*. *Mol Microbiol.* 31(2):421-8.
- Cavalier-Smith T.** (2000). Membrane heredity and early chloroplast evolution. *Trends Plant Sci.* 5(4):174-82.
- Cavalier-Smith T.** (2001). Obcells as proto-organisms: membrane heredity, lithophosphorylation, and the origins of the genetic code, the first cells, and photosynthesis. *J Mol Evol.* 53(4-5):555-95.
- Cavalier-Smith T.** (2002). Chloroplast evolution: secondary symbiogenesis and multiple losses. *Curr Biol.* 12(2):R62-4.
- Cavalier-Smith T.** (2003). Genomic reduction and evolution of novel genetic membranes and protein-targeting machinery in eukaryote-eukaryote chimaeras (meta-algae). *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 358(1429):109-33.
- Cavalier-Smith T, Chao EE.** (2006). Phylogeny and megasystematics of phagotrophic heterokonts (kingdom Chromista). *J Mol Evol.* 62(4):388-420.
- Chen K, Chen X, Schnell DJ.** (2000). Initial binding of preproteins involving the Toc159 receptor can be bypassed during protein import into chloroplasts. *Plant Physiol.* 122(3):813-22.



- Chou ML, Chu CC, Chen LJ, Akita M, Li HM.** (2006). Stimulation of transit-peptide release and ATP hydrolysis by a cochaperone during protein import into chloroplasts. *J Cell Biol.* 175(6):893-900.
- Clantin B, Delattre AS, Rucktooa P, Saint N, Méli AC, Loch C, Jacob-Dubuisson F, Villeret V.** (2007). Structure of the membrane protein FhaC: a member of the Omp85-TpsB transporter superfamily. *Science.* 317(5840):957-61.
- Coppens I.** (2006). Contribution of host lipids to *Toxoplasma* pathogenesis. *Cell Microbiol.* 8(1):1-9.
- Coppens I, Dunn JD, Romano JD, Pypaert M, Zhang H, Boothroyd JC, Joiner KA.** (2006). *Toxoplasma gondii* sequesters lysosomes from mammalian hosts in the vacuolar space. *Cell.* 125(2):261-74.
- Craig A, Kyes S, Chan MS, Nene V, Shallom SJ, Suh B, Peterson J, Angiuoli S, Pertea M, Allen J, Selengut J, Haft D, Mather MW, Vaidya AB, Martin DM, Fairlamb AH, Fraunholz MJ, Roos DS, Ralph SA, McFadden GI, Cummings LM, Subramanian GM, Mungall C, Venter JC, Carucci DJ, Hoffman SL, Newbold C, Davis RW, Fraser CM, Barrell B.** (2002). Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature.* 419(6906):498-511.
- Crawford MJ, Thomsen-Zieger N, Ray M, Schachtner J, Roos DS, Seeber F.** (2006). *Toxoplasma gondii* scavenges host-derived lipoic acid despite its de novo synthesis in the apicoplast. *EMBO J.* 25(13):3214-22.
- Dahl EL, Shock JL, Shenai BR, Gut J, DeRisi JL, Rosenthal PJ.** (2006). Tetracyclines specifically target the apicoplast of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother.* 50(9):3124-31.
- Delattre AS, Clantin B, Saint N, Loch C, Villeret V, Jacob-Dubuisson F.** (2010). Functional importance of a conserved sequence motif in FhaC, a prototypic member of the TpsB/Omp85 superfamily. *FEBS J.* (22):4755-65.
- DeRocher AE, Coppens I, Karnataki A, Gilbert LA, Rome ME, Feagin JE, Bradley PJ, Parsons M.** (2008). A thioredoxin family protein of the apicoplast periphery identifies abundant candidate transport vesicles in *Toxoplasma gondii*. *Eukaryot Cell.* 7(9):1518-29.
- Derocher AE, Karnataki A, Vaney P, Parsons M.** (2012). Apicoplast targeting of a *T. gondii* transmembrane protein requires a cytosolic tyrosine-based motif. *Traffic.* 10.1111/j.1600-0854.
- Ding M, Clayton C, Soldati D.** (2000). *Toxoplasma gondii* catalase: are there peroxisomes in toxoplasma? *J Cell Sci.* 113 (Pt 13):2409-19.
- Donald, R. G. K. & Roos, D. S.** 1994 Homologous recombination and gene replacement at the dihydrofolate reductase/thymidylate synthase locus in *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 63, 243–253.

- Douglas S, Zauner S, Fraunholz M, Beaton M, Penny S, Deng LT, Wu X, Reith M, Cavalier-Smith T, Maier UG.** (2001). The highly reduced genome of an enslaved algal nucleus. *Nature*. 410(6832):1091-6.
- Dubey JP.** (1997). Bradyzoite-induced murine toxoplasmosis: stage conversion, pathogenesis, and tissue cyst formation in mice fed bradyzoites of different strains of *Toxoplasma gondii*. *J Eukaryot Microbiol*.44(6):592-602.
- Dubey JP.** (1998). Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol*. 28(7):1019-24.
- Dubey JP.** (2002). A review of toxoplasmosis in wild birds. *Vet Parasitol.*;106(2):121-53.
- Dubey JP.** (2008). The history of *Toxoplasma gondii* the first 100 years. *J Eukaryot Microbiol*.55(6):467-75.
- Dubey JP, Frenkel JK.** (1976). Feline toxoplasmosis from acutely infected mice and the development of *Toxoplasma* cysts. *J Protozool*.23(4):537-46.
- Endo T, Yamano K.** (2010). Transport of proteins across or into the mitochondrial outer membrane. *Biochim Biophys Acta*. 1803(6):706-14.
- Ertel F, Mirus O, Bredemeier R, Moslavac S, Becker T, Schleiff E.** (2005). The evolutionarily related beta-barrel polypeptide transporters from *Pisum sativum* and *Nostoc PCC7120* contain two distinct functional domains. *J Biol Chem*. 280(31):28281-9.
- Fichera ME, Roos DS.** (1997). A plastid organelle as a drug target in apicomplexan parasites. *Nature*. 390(6658):407-9.
- Foth BJ, McFadden GI.** (2003). The apicoplast: a plastid in *Plasmodium falciparum* and other Apicomplexan parasites. *Int Rev Cytol*.224:57-110.
- Gardner MJ, Hall N, Fung E, White O, Berriman M, Hyman RW, Carlton JM, Pain A, Nelson KE, Bowman S, Paulsen IT, James K, Eisen JA, Rutherford K, Salzberg SL, Genevrois S, Steeghs L, Roholl P, Letesson JJ, van der Ley P.** (2003). The Omp85 protein of *Neisseria meningitidis* is required for lipid export to the outer membrane. *EMBO J*.22(8):1780-9.
- Gentle I, Gabriel K, Beech P, Waller R, Lithgow T.** (2004). The Omp85 family of proteins is essential for outer membrane biogenesis in mitochondria and bacteria. *J Cell Biol*. 164(1):19-24.
- Gentle IE, Burri L, Lithgow T.** (2005). Molecular architecture and function of the Omp85 family of proteins. *Mol Microbiol*. 58(5):1216-25.
- Gilson PR, McFadden GI.** (1996). The miniaturized nuclear genome of eukaryotic endosymbiont contains genes that overlap, genes that are cotranscribed, and the smallest known spliceosomal introns. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93(15):7737-42.

- Gilson PR, Su V, Slamovits CH, Reith ME, Keeling PJ, McFadden GI.** (2006). Complete nucleotide sequence of the chlorarachniophyte nucleomorph: nature's smallest nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(25):9566-71.
- Goodman CD, Su V, McFadden GI.** (2007). The effects of anti-bacterials on the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol.* 152(2):181-91.
- Goodman CD, McFadden GI.** (2007). Fatty acid biosynthesis as a drug target in apicomplexan parasites. *Curr Drug Targets.* 8(1):15-30.
- Gould SB, Sommer MS, Hadfi K, Zauner S, Kroth PG, Maier UG.** (2006). Protein targeting into the complex plastid of cryptophytes. *J Mol Evol.* 62(6):674-81.
- Gould SB, Waller RF, McFadden GI.** (2008). Plastid evolution. *Annu Rev Plant Biol.* 59:491-517.
- Grigg ME, Sundar N.** (2009). Sexual recombination punctuated by outbreaks and clonal expansions predicts *Toxoplasma gondii* population genetics. *Int J Parasitol.* 39(8):925-33.
- Gupta N, Zahn MM, Coppens I, Joiner KA, Voelker DR.** (2005). Selective disruption of phosphatidylcholine metabolism of the intracellular parasite *Toxoplasma gondii* arrests its growth. *J Biol Chem.* 280(16):16345-53.
- Habib SJ, Waizenegger T, Niewianda A, Paschen SA, Neupert W, Rapaport D.** (2007). The N-terminal domain of Tob55 has a receptor-like function in the biogenesis of mitochondrial beta-barrel proteins. *J Cell Biol.* 176(1):77-88.
- Harb OS, Chatterjee B, Fraunholz MJ, Crawford MJ, Nishi M, Roos DS.** (2004). Multiple functionally redundant signals mediate targeting to the apicoplast in the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *Eukaryot Cell.* 3(3):663-74.
- Heins L, Mehrle A, Hemmler R, Wagner R, Kuchler M, Hörmann F, Sveshnikov D, Soll J.** (2002). The preprotein conducting channel at the inner envelope membrane of plastids. *EMBO J.* 21(11):2616-25.
- Hempel F, Bullmann L, Lau J, Zauner S, Maier UG.** (2009). ERAD-derived preprotein transport across the second outermost plastid membrane of diatoms. *Mol Biol Evol.* 26(8):1781-90.
- Herm-Götz A, Agop-Nersesian C, Münter S, Grimley JS, Wandless TJ, Frischknecht F, Meissner M.** (2007). Rapid control of protein level in the apicomplexan *Toxoplasma gondii*. *Nat Methods.* 4(12):1003-5.
- Hinnah SC, Hill K, Wagner R, Schlicher T, Soll J.** (1997). Reconstitution of a chloroplast protein import channel. *EMBO J.* 16(24):7351-60.
- Hirsch S, Muckel E, Heemeyer F, von Heijne G, Soll J.** (1994). A receptor component of the chloroplast protein translocation machinery. *Science.* 266(5193):1989-92.

- Ho-Yen DO.** (2001). Infection in the immunocompetent. Toxoplasmosis: a comprehensive clinical guide (eds D.H.M. Joynson & T.G. Wreghitt). Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Hu CD, Chinenov Y, Kerppola TK.** (2002). Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol Cell.* 9(4):789-98.
- Jacob-Dubuisson F, Villeret V, Clantin B, Delattre AS, Saint N.** (2009). First structural insights into the TpsB/Omp85 superfamily. *Biol Chem.* 390(8):675-84.
- Jarvis P.** (2008). Targeting of nucleus-encoded proteins to chloroplasts in plants. *New Phytol.* 179(2):257-85.
- Joiner KA, Fuhrman SA, Miettinen HM, Kasper LH, Mellman I.** (1990). *Toxoplasma gondii*: fusion competence of parasitophorous vacuoles in Fc receptor-transfected fibroblasts. *Science.* 249(4969):641-6.
- Jones JL, Kruszon-Moran D, Wilson M, McQuillan G, Navin T, McAuley JB.** (2001). *Toxoplasma gondii* infection in the United States: seroprevalence and risk factors. *Am. J Epidemiol.* 154(4):357-65.
- Kaasch AJ, Joiner KA.** (2000). Targeting and subcellular localization of *Toxoplasma gondii* catalase. Identification of peroxisomes in an apicomplexan parasite. *J Biol Chem.* 275(2):1112-8. *Protist* 2000 Aug;151(2):103-9.
- Kalanon M, Tonkin CJ, McFadden GI.** (2009). Characterization of two putative protein translocation components in the apicoplast of *Plasmodium falciparum*. *Eukaryot Cell.* 8(8):1146-54.
- Karnataki A, Derocher AE, Coppens I, Feagin JE, Parsons M.** (2007). A membrane protease is targeted to the relict plastid of *Toxoplasma* via an internal signal sequence. *Traffic.* 8(11):1543-53.
- Keeling PJ.** (2010). The endosymbiotic origin, diversification and fate of plastids. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 365(1541):729-48.
- Kessler F, Blobel G, Patel HA, Schnell DJ.** (1994). Identification of two GTP-binding proteins in the chloroplast protein import machinery. *Science.* 266(5187):1035-9.
- Kessler F, Schnell DJ.** (2006). The function and diversity of plastid protein import pathways: a multilane GTPase highway into plastids. *Traffic.* 7(3):248-57.
- Kilian O, Kroth PG.** (2005). Identification and characterization of a new conserved motif within the presequence of proteins targeted into complex diatom plastids. *Plant J.* 41(2):175-83.
- Kim K, Soldati D, Boothroyd JC.** (1993). Gene replacement in *Toxoplasma gondii* with chloramphenicol acetyltransferase as selectable marker. *Science.* 262(5135):911-4.

- Kim S, Malinverni JC, Sliz P, Silhavy TJ, Harrison SC, Kahne D.** (2007). Structure and function of an essential component of the outer membrane protein assembly machine. *Science*. 317(5840):961-4.
- Kleine T, Maier UG, Leister D.** (2009). DNA transfer from organelles to the nucleus: the idiosyncratic genetics of endosymbiosis. *Annu Rev Plant Biol*. 60:115-38.
- Knowles TJ, Scott-Tucker A, Overduin M, Henderson IR.** (2009). Membrane protein architects: the role of the BAM complex in outer membrane protein assembly. *Nat Rev Microbiol*. 7(3):206-14.
- Koenig P, Mirus O, Haarmann R, Sommer MS, Sinning I, Schleiff E, Tews I.** (2010). Conserved properties of polypeptide transport-associated (POTRA) domains derived from cyanobacterial Omp85. *J Biol Chem*. 285(23):18016-24.
- Köhler S, Delwiche CF, Denny PW, Tilney LG, Webster P, Wilson RJ, Palmer JD, Roos DS.** (1997). A plastid of probable green algal origin in Apicomplexan parasites. *Science*. 275(5305):1485-9.
- Köhler S.** (2005). Multi-membrane-bound structures of Apicomplexa: I. the architecture of the *Toxoplasma gondii* apicoplast. *Parasitol Res*. 96(4):258-72.
- Kovács-Bogdán E, Soll J, Bölder B.** (2010). Protein import into chloroplasts: the Tic complex and its regulation. *Biochim Biophys Acta*. 1803(6):740-7. Epub 2010 Jan 25.
- Kozjak V, Wiedemann N, Milenkovic D, Lohaus C, Meyer HE, Guiard B, Meisinger C, Pfanner N.** (2003). An essential role of Sam50 in the protein sorting and assembly machinery of the mitochondrial outer membrane. *J Biol Chem*. 278(49):48520-3.
- Kutik S, Stojanovski D, Becker L, Becker T, Meinecke M, Krüger V, Prinz C, Meisinger C, Guiard B, Wagner R, Pfanner N, Wiedemann N.** (2008). Dissecting membrane insertion of mitochondrial beta-barrel proteins. *Cell*. 132(6):1011-24.
- Kutschera U, Niklas KJ.** (2005). Endosymbiosis, cell evolution, and speciation. *Theory Biosci*. 124(1):1-24.
- Kyte J, Doolittle RF.** (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol*. 157(1):105-32.
- Laemmli UK.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227(5259):680-5.
- Li HM, Chiu CC.** (2010). Protein transport into chloroplasts. *Annu Rev Plant Biol*. 61:157-80.
- Lim L, McFadden GI.** (2010). The evolution, metabolism and functions of the apicoplast. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 365(1541):749-63.
- Ma Y, Kouranov A, LaSala SE, Schnell DJ.** (1996). Two components of the chloroplast protein import apparatus, IAP86 and IAP75, interact with the transit sequence during the recognition and translocation of precursor proteins at the outer envelope. *J Cell Biol*. 134(2):315-27.

- Maier UG, Douglas SE, Cavalier-Smith T.** (2000). The nucleomorph genomes of cryptophytes and chlorarachniophytes. *Protist* 151(2):103-9.
- Margulis L.** (1971). Symbiosis and evolution. *Sci Am.* 225(2):48-57.
- Martin AM, Liu T, Lynn BC, Sinai AP.** (2007). The *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane: transactions across the border. *J Eukaryot Microbiol.* 54(1):25-8.
- May T, Soll J.** (2000). 14-3-3 proteins form a guidance complex with chloroplast precursor proteins in plants. *Plant Cell.* 12(1):53-64.
- McFadden GI, Reith ME, Munholland J, Lang-Unnasch N.** (1996). Plastid in human parasites. *Nature.* 381(6582):482.
- McFadden GI, van Dooren GG.** (2004). Evolution: red algal genome affirms a common origin of all plastids. *Curr Biol.* 14(13):R514-6.
- Meissner M, Schlüter D, Soldati D.** (2002). Role of *Toxoplasma gondii* myosin A in powering parasite gliding and host cell invasion. *Science.* 298(5594):837-40.
- Mercier C, Adjogble KD, Däubener W, Delauw MF.** (2005). Dense granules: are they key organelles to help understand the parasitophorous vacuole of all apicomplexa parasites? *Int J Parasitol.* 35(8):829-49.
- Mereschkowski ,K.** (1905). Über Natur und Ursprung der Chromtophoren im Pflanzenreiche. *Biol Centralbl* (25), 593-604.
- Misra R.** (2007). First glimpse of the crystal structure of YaeT's POTRA domains. *ACS Chem Biol.* 2(10):649-51.
- Mitterauer T, Nanoff C, Ahorn H, Freissmuth M, Hohenegger M.** (1999). Metal-dependent nucleotide binding to the Escherichia coli rotamase SlyD. *Biochem J.* 342 (Pt 1):33-9.
- Mordue DG, Sibley LD.** (1997). Intracellular fate of vacuoles containing *Toxoplasma gondii* is determined at the time of formation and depends on the mechanism of entry. *J Immunol.* 159(9):4452-9.
- Morrisette NS, Sibley LD.** (2002). Cytoskeleton of apicomplexan parasites. *Microbiol Mol Biol Rev.* 66(1):21-38.
- Moslavac S, Mirus O, Bredemeier R, Soll J, von Haeseler A, Schleiff E.** (2005). Conserved pore-forming regions in polypeptide-transporting proteins. *FEBS J.* 272(6):1367-78.
- Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S, von Heijne G.** (1997). Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng.* 10(1):1-6.
- Nielsen E, Akita M, Davila-Aponte J, Keegstra K.** (1997). Stable association of chloroplastic precursors with protein translocation complexes that contain proteins from both envelope membranes and a stromal Hsp100 molecular chaperone. *EMBO J.* 16(5):935-46.

- Ohad N, Shichrur K, Yalovsky S.** (2007). The analysis of protein-protein interactions in plants by bimolecular fluorescence complementation. *Plant Physiol.* 145(4):1090-9.
- Onufryk C, Crouch ML, Fang FC, Gross CA.** (2005). Characterization of six lipoproteins in the sigmaE regulon. *J Bacteriol.* 187(13):4552-61.
- Palenik B.** (2002). The genomics of symbiosis: hosts keep the baby and the bath water. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(19):11996-7.
- Palmer J.D.** (2003). The symbiotic birth and spread of plastids: How many times and whodunit? *J. Phycol.* 39, 4-11.
- Parsy CB, Chapman CJ, Barnes AC, Robertson JF, Murray A.** (2007). Two-step method to isolate target recombinant protein from co-purified bacterial contaminant SlyD after immobilised metal affinity chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 853(1-2):314-9.
- Paschen SA, Waizenegger T, Stan T, Preuss M, Cyrklaff M, Hell K, Rapaport D, Neupert W.** (2003). Evolutionary conservation of biogenesis of beta-barrel membrane proteins. *Nature.* 426(6968):862-6.
- Patron NJ, Waller RF, Archibald JM, Keeling PJ.** (2005). Complex protein targeting to dinoflagellate plastids. *J Mol Biol.* 348(4):1015-24.
- Pelletier L, Stern CA, Pypaert M, Sheff D, Ngô HM, Roper N, He CY, Hu K, Toomre D, Coppens I, Roos DS, Joiner KA, Warren G.** (2002). Golgi biogenesis in *Toxoplasma gondii*. *Nature* 418(6897):548-52.
- Perry SE, Keegstra K.** (1994). Envelope membrane proteins that interact with chloroplastic precursor proteins. *Plant Cell.* 6(1):93-105.
- Pflugger SL, Goodson HV, Moran JM, Ruggiero CJ, Ye X, Emmons KM, Hager KM.** (2005). Receptor for retrograde transport in the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *Eukaryot Cell.* 4(2):432-42.
- Qbadou S, Becker T, Mirus O, Tews I, Soll J, Schleiff E.** (2006). The molecular chaperone Hsp90 delivers precursor proteins to the chloroplast import receptor Toc64. *EMBO J.* 25(9):1836-47.
- Ralph SA, van Dooren GG, Waller RF, Crawford MJ, Fraunholz MJ, Foth BJ, Tonkin CJ, Roos DS, McFadden GI.** (2004). Tropical infectious diseases: metabolic maps and functions of the *Plasmodium falciparum* apicoplast. *Nat Rev Microbiol.* 2(3):203-16.
- Rapoport TA.** (2007). Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes. *Nature.* 450(7170):663-9.
- Reumann S, Keegstra K.** (1999). The endosymbiotic origin of the protein import machinery of chloroplastic envelope membranes. *Trends Plant Sci.* 4(8):302-307.
- Richter S, Lamppa GK.** (1998). A chloroplast processing enzyme functions as the general stromal processing peptidase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(13):7463-8.

- Robert V, Volokhina EB, Senf F, Bos MP, Van Gelder P, Tommassen J.** (2006). Assembly factor Omp85 recognizes its outer membrane protein substrates by a species-specific C-terminal motif. *PLoS Biol.* 4(11):e377.
- Robichon C, Luo J, Causey TB, Benner JS, Samuelson JC.** (2011). Engineering *Escherichia coli* BL21(DE3) derivative strains to minimize *E. coli* protein contamination after purification by immobilized metal affinity chromatography. *Appl Environ Microbiol.* 77(13):4634-46.
- Rodríguez-Ezpeleta N, Brinkmann H, Burey SC, Roure B, Burger G, Löffelhardt W, Bohnert HJ, Philippe H, Lang BF.** (2005). Monophyly of primary photosynthetic eukaryotes: green plants, red algae, and glaucophytes. *15(14):1325-30.*
- Rogers MB, Gilson PR, Su V, McFadden GI, Keeling PJ.** (2007). The complete chloroplast genome of the chlorarachniophyte *Bigeloviella natans*: evidence for independent origins of chlorarachniophyte and euglenid secondary endosymbionts. *Mol Biol Evol.* (1):54-62.
- Roos, D. S., Donald, R. G. K., Morrisette, N. S. & Moulton, A. L. C.** (1994). Molecular tools for genetic dissection of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Meth. Cell Biol.* 45, 27–63.
- Roos DS, Crawford MJ, Donald RG, Fraunholz M, Harb OS, He CY, Kissinger JC, Shaw MK, Striepen B.** (2002). Mining the *Plasmodium* genome database to define organellar function: what does the apicoplast do? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 357(1417):35-46.
- Sagan L.** (1967). On the origin of mitosing cells. *J Theor Biol.* 14(3):255-74.
- Saier MH Jr.** (2006). Protein secretion and membrane insertion systems in gram-negative bacteria. *J Membr Biol.* 214(2):75-90.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA.** (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 239(4839):487-91.
- Sánchez-Pulido L, Devos D, Genevrois S, Vicente M, Valencia A.** (2003). POTRA: a conserved domain in the FtsQ family and a class of beta-barrel outer membrane proteins. *Trends Biochem Sci.* 28(10):523-6.
- Sam-Yellowe TY.** (1996). Rhoptry organelles of the apicomplexa: Their role in host cell invasion and intracellular survival. *Parasitol Today.* 12(8):308-16.
- Sato S, Clough B, Coates L, Wilson RJ.** (2004). Enzymes for heme biosynthesis are found in both the mitochondrion and plastid of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Protist.* 155(1):117-25.
- Sato S.** (2011). The apicomplexan plastid and its evolution. *Cell Mol Life Sci.* 68(8):1285-96.
- Schleiff E, Soll J, Küchler M, Kühlbrandt W, Harrer R.** (2003). Characterization of the translocon of the outer envelope of chloroplasts. *J Cell Biol.* 160(4):541-51.



**Schleiff E, Soll J.** (2005). Membrane protein insertion: mixing eukaryotic and prokaryotic concepts. *EMBO Rep.* 6(11):1023-7.

**Schleiff E, Maier UG, Becker T.** (2011). Omp85 in eukaryotic systems: one protein family with distinct functions. *Biol Chem.* 392(1-2):21-7.

**Schnell DJ, Kessler F, Blobel G.** (1994). Isolation of components of the chloroplast protein import machinery. *Science.* 266(5187):1007-12.

**Scholz C, Eckert B, Hagn F, Schaarschmidt P, Balbach J, Schmid FX.** (2006). SlyD proteins from different species exhibit high prolyl isomerase and chaperone activities. *Biochemistry.* 45(1):20-33.

**Schulz GE.** (2000). Beta-Barrel membrane proteins. *Curr Opin Struct Biol.* 10(4):443-7.

**Schwab JC, Beckers CJ, Joiner KA.** (1994). The parasitophorous vacuole membrane surrounding intracellular *Toxoplasma gondii* functions as a molecular sieve. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91(2):509-13.

**Seedorf M, Waegemann K, Soll J.** (1995). A constituent of the chloroplast import complex represents a new type of GTP-binding protein. *Plant J.* 7(3):401-11.

**Sheiner L, Demerly JL, Poulsen N, Beatty WL, Lucas O, Behnke MS, White MW, Striepen B.** (2011). A systematic screen to discover and analyze apicoplast proteins identifies a conserved and essential protein import factor. *PLoS Pathog.* 7(12):e1002392.

**Sibley LD, Messina M, Niesman IR.** (2004). Stable DNA transformation in the obligate intracellular parasite *Toxoplasma gondii* by complementation of tryptophan auxotrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91(12):5508-12.

**Sibley LD, Khan A, Ajioka JW, Rosenthal BM.** (2009). Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in animals and humans. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 364(1530):2749-61.

**Singh K, Bhakuni V.** (2008). *Toxoplasma gondii* ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductase: Role of ionic interactions in stabilization of native conformation and structural cooperativity. *Proteins.* 71(4):1879-88.

**Sklar JG, Wu T, Gronenberg LS, Malinverni JC, Kahne D, Silhavy TJ.** (2007). Lipoprotein SmpA is a component of the YaeT complex that assembles outer membrane proteins in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(15):6400-5.

**Soll J, Schleiff E.** (2004). Protein import into chloroplasts. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5(3):198-208.

**Sommer MS, Gould SB, Lehmann P, Gruber A, Przyborski JM, Maier UG.** (2007). Der1-mediated preprotein import into the periplastid compartment of chromalveolates? *Mol Biol Evol.* (4):918-28.

**Sommer MS, Schleiff E.** (2009). Molecular interactions within the plant TOC complex. *Biol Chem.* 390(8):739-44.

- Sommer MS, Daum B, Gross LE, Weis BL, Mirus O, Abram L, Maier UG, Kühlbrandt W, Schleiff E.** (2011). Chloroplast Omp85 proteins change orientation during evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108(33):13841-6.
- Spork S, Hiss JA, Mandel K, Sommer M, Kooij TW, Chu T, Schneider G, Maier UG, Przyborski JM.** (2009). An unusual ERAD-like complex is targeted to the apicoplast of *Plasmodium falciparum*. *Eukaryot Cell.* 8(8):1134-45.
- Stoebe B, Maier UG.** (2002). One, two, three: nature's tool box for building plastids. *Protoplasma* 219(3-4):123-30.
- Striepen B.** (2007). Switching parasite proteins on and off. *Nat Methods.* 4(12):999-1000.
- Striepen B. und S oldati. D.** (2007). Genetic manipulation of *Toxoplasma gondii*. In *Toxoplasma gondii: The Model Apicomplexan - Perspective and Methods*, L.M. Weiss and K. Kim, eds. (London: Academic Press),pp. 391–415.
- Struyvé M, Moons M, Tommassen J.** (1991). Carboxy-terminal phenylalanine is essential for the correct assembly of a bacterial outer membrane protein. *J Mol Biol.* 218(1):141-8.
- Sveshnikova N, Grimm R, Soll J, Schleiff E.** (2000). Topology studies of the chloroplast protein import channel Toc75. *Biol Chem.* 381(8):687-93.
- Tenter AM, Heckerroth AR, Weiss LM.** (2000). *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol.* 30(12-13):1217-58.
- Tetlow IJ, Bowsher CG, Emes MJ.** (1996). Reconstitution of the hexose phosphate translocator from the envelope membranes of wheat endosperm amyloplasts. *Biochem J.* 319 (Pt 3):717-23.
- Tomova C, Geerts WJ, Müller-Reichert T, Entzeroth R, Humbel BM.** (2006). New comprehension of the apicoplast of *Sarcocystis* by transmission electron tomography. *Biol Cell.* 98(9):535-45.
- Tomova C, Humbel BM, Geerts WJ, Entzeroth R, Holthuis JC, Verkleij AJ.** (2009). Membrane contact sites between apicoplast and ER in *Toxoplasma gondii* revealed by electron tomography. *Traffic.* (10):1471-80.
- Tonkin CJ, Struck NS, Mullin KA, Stimmler LM, McFadden GI.** (2006). Evidence for Golgi-independent transport from the early secretory pathway to the plastid in malaria parasites. *Mol Microbiol.* 61(3):614-30.
- Tonkin CJ, Roos DS, McFadden GI.** (2006). N-terminal positively charged amino acids, but not their exact position, are important for apicoplast transit peptide fidelity in *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol.* 150(2):192-200.
- Toso MA, Omoto CK.** (2007). *Gregarina niphandrodes* may lack both a plastid genome and organelle. *J Eukaryot Microbiol.* 54(1):66-72.

- Towbin H, Staehelin T, Gordon J.** (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Biotechnology*. 1992;24:145-9.
- Tsai B, Ye Y, Rapoport TA.** (2002). Retro-translocation of proteins from the endoplasmic reticulum into the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 3(4):246-55.
- van Dooren GG, Tomova C, Agrawal S, Humbel BM, Striepen B.** (2008). *Toxoplasma gondii* Tic20 is essential for apicoplast protein import. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105(36):13574-9.
- van Dooren GG, Reiff SB, Tomova C, Meissner M, Humbel BM, Striepen B.** (2009). A novel dynamin-related protein has been recruited for apicoplast fission in *Toxoplasma gondii*. *Curr Biol*. 19(4):267-76.
- Voulhoux R, Bos MP, Geurtsen J, Mols M, Tommassen J.** (2003). Role of a highly conserved bacterial protein in outer membrane protein assembly. *Science*. 299(5604):262-5.
- Voulhoux R, Tommassen J.** (2004). Omp85, an evolutionarily conserved bacterial protein involved in outer-membrane-protein assembly. *Res Microbiol*. 155(3):129-35.
- Vuong P, Bennion D, Mantei J, Frost D, Misra R.** (2008). Analysis of YfgL and YaeT interactions through bioinformatics, mutagenesis, and biochemistry. *J Bacteriol*. 190(5):1507-17.
- Waller RF, Keeling PJ, Donald RG, Striepen B, Handman E, Lang-Unnasch N, Cowman AF, Besra GS, Roos DS, McFadden GI.** (1998). Nuclear-encoded proteins target to the plastid in *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95(21):12352-7.
- Waller RF, Reed MB, Cowman AF, McFadden GI.** (2000). Protein trafficking to the plastid of *Plasmodium falciparum* is via the secretory pathway. *EMBO J*. 19(8):1794-802.
- Waller RF, McFadden GI.** (2005). The apicoplast: a review of the derived plastid of apicomplexan parasites. *Curr Issues Mol Biol*.;7(1):57-79.
- Wastl J, Maier UG.** (2000). Transport of proteins into cryptomonads complex plastids. *J Biol Chem*. 275(30):23194-8.
- Wilson RJ, Williamson DH, Preiser P.** (1994). Malaria and other Apicomplexans: the "plant" connection. *Infect Agents Dis*. 3(1):29-37.
- Wilson RJ, Denny PW, Preiser PR, Rangachari K, Roberts K, Roy A, Whyte A, Strath M, Moore DJ, Moore PW, Williamson DH.** (1996). Complete gene map of the plastid-like DNA of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Mol Biol*. 261(2):155-72.
- Wilson RJ, Williamson DH.** (1997). Extrachromosomal DNA in the Apicomplexa. *Microbiol Mol Biol Rev*. 61(1):1-16.

**Wu T, Malinverni J, Ruiz N, Kim S, Silhavy TJ, Kahne D.** (2005). Identification of a multicomponent complex required for outer membrane biogenesis in *Escherichia coli*. *Cell*.121(2):235-45.

**Wunder T, Martin R, Löffelhardt W, Schleiff E, Steiner JM.** (2007). The invariant phenylalanine of precursor proteins discloses the importance of Omp85 for protein translocation into cyanelles. *BMC Evol Biol*.7:236.

**Wülfing C, Lombardero J, Plückthun A.** (1994). An *Escherichia coli* protein consisting of a domain homologous to FK506-binding proteins (FKBP) and a new metal binding motif. *J Biol Chem*.269(4):2895-901.

**Ye Y, Shibata Y, Yun C, Ron D, Rapoport TA.** (2004). A membrane protein complex mediates retro-translocation from the ER lumen into the cytosol. *Nature*. 429(6994):841-7.

**Zuegge J, Ralph S, Schmuker M, McFadden GI, Schneider G.** (2001). Deciphering apicoplast targeting signals--feature extraction from nuclear-encoded precursors of *Plasmodium falciparum* apicoplast proteins. *Gene*. 280(1-2):19-26.

**Zhu G, Marchewka MJ, Keithly JS.** (2000). *Cryptosporidium parvum* appears to lack a plastid genome. *Microbiology*. 146 (Pt 2):315-21.

## **Danksagung**

Mein erster Dank gilt Herrn PD Dr. Jude Przyborski für die Überlassung des spannenden und fordernden Projekts. Darüber hinaus bedanke ich mich bei ihm besonders für die intensive Betreuung in Höhen und Tiefen und seine Motivation, sowie für alles, was ich in dieser Zeit von ihm lernen durfte.

Herrn Prof. Dr. Uwe Maier danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens und die Kooperation während meiner Doktorarbeit.

Ein besonderer Dank geht auch an Herrn Prof. Dr. Klaus Lingelbach für seine Unterstützung und Hilfsbereitschaft. Des Weiteren danke ich ihm für seine Bereitschaft Teil meiner Prüfungskommission zu sein.

Prof. Dr. Erhard Bremer danke ich ebenfalls für seine Bereitschaft Mitglied meiner Prüfungskommission zu sein.

Der Fazit-Stiftung und des Graduiertenkollegs danke ich für ihre finanzielle Unterstützung zu Beginn meiner Promotion.

Danken möchte ich auch der AG Maier für die Hilfeleistungen und Bereitstellung von Materialien und Geräten.

Dr. Markus Winterberg, Dr. Stefan Charpian und Dr. Omid Azimzadeh danke ich sehr für ihre nie endende Hilfsbereitschaft und Unterstützung.

Der gesamten Arbeitsgruppe Lingelbach, einschließlich meiner ehemaligen Arbeitskollegen, danke ich für ihre Unterstützung und die nette Arbeitsatmosphäre im Labor.

Besonders danken möchte ich auch Frank Lennartz, Dr. Hosam Shams-Eldin, Sebastian Kölzer, Daniel Knack und Vera Sampels für ihre große Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

Last but not least möchte ich Sven, meinen Eltern und Schwiegereltern, sowie meinen Freunden für ihre ewige Unterstützung danken. Vielen Dank für alles.

## Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich meine Dissertation

### Der Nachweis eines Mitglieds der OMP85-Proteinfamilie im Apikoplasten von *Toxoplasma gondii*

selbständig, ohne unerlaubte Hilfe und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe. Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 15.06.12

Irine Bietz

---

Ort, Datum

---

Unterschrift (Vor- und Zuname)